

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE

PROF. DR. RALPH WITZGALL

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

(BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN)

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG INDUZIERBARER, PODOZYTENSPEZIFISCHER *LMX1B* KNOCK-OUT
MÄUSE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Magdalena Emma Schaffer

2011

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE

PROF. DR. RALPH WITZGALL

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

(BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN)

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG INDUZIERBARER, PODOZYTENSPEZIFISCHER *LMX1B* KNOCK-OUT
MÄUSE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Magdalena Emma Schaffer

2011

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Witzgall
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	15.05.2012

1. Einleitung	
1.1. Entwicklung, Aufbau und Funktion der Niere	1
1.1.1. Embryonale Entwicklung der Niere	1
1.1.2. Aufbau und Funktion der adulten Niere	1
A) Makroskopischer Aufbau	1
B) Mikroskopischer Aufbau	1
C) Funktion der Niere	4
1.2. Das Nagel-Patella Syndrom und seine Assoziation mit <i>LMX1B</i>	4
1.2.1. Klinische Symptomatik des Nagel-Patella Syndroms (NPS)	4
A) Allgemeine Symptomatik	4
B) Nierensymptomatik	5
1.2.2. <i>LMX1B</i>	6
A) Die Struktur des „NPS-Gens“ <i>LMX1B</i>	6
B) Struktur und Funktion des Transkriptionsfaktors <i>LMX1B</i>	6
C) Mutationen in <i>LMX1B</i> und der daraus resultierende Phänotyp	7
D) Tiermodelle für das Nagel-Patella Syndrom und ihre Problematik	8
1.3. Retinoblastom – Klinische Bedeutung und Tiermodell	11
1.3.1. Struktur von pRB	11
1.3.2. Bedeutung des <i>Rb</i> -Gens	11
1.3.3. Tiermodelle zur Untersuchung der Funktionen der pRB-Proteinfamilie	12
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Materialien	15
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.2. Enzyme	18
2.1.3. Kits	18
2.1.4. Genchips	19
2.1.5. Verbrauchsmaterial	19
2.1.6. Geräte	21
2.1.7. Software	23
2.1.8. Internetquellen	24
2.1.9. Oligonukleotide	24
2.1.10. Mauslinien	25

2.2. Methoden	26
2.2.1. Genotypisierung von Mäusen	26
A) Präparation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	26
B) Bestimmung der DNA-Konzentration	27
C) Bestimmung des Genotyps mittels Polymerasekettenreaktion	27
D) Bestimmung des Genotyps mittels Southern Blot	32
2.2.2. Perfusion von Mäusen und Weiterverarbeitung der perfundierten Nieren	36
A) Perfusion für Licht- und Elektronenmikroskopie	36
B) Präparation von Mäusenieren für die Lichtmikroskopie	38
C) Präparation von Mäusenieren für die Elektronenmikroskopie	39
D) HE- und PAS-Färbung von Paraffinschnitten	39
2.2.3. Glomerulipräparation und RNA-Isolation	41
A) Induktion von rtTA / LC1 / <i>Lmx1b</i> ^{2loxP} – Mäusen	41
B) Perfusion für die magnetische Isolation von Glomeruli	42
C) Glomerulipräparation	44
D) RNA-Isolation aus Glomeruli	45
E) Analyse der Genexpression	45
2.2.4. Untersuchung verschiedener Nierenschädigungsmodelle an Mäusen	46
A) Präimmunisierung und Injektion von Anti-GBM-Serum	46
B) Injektion von Lipopolysaccharid	47
C) Implantation eines DOCA-Pellets und einer Angiotensin II-Pumpe nach Uninephrektomie	47
D) Erstellung von Überlebenskurven bei <i>Rb-lox3(926)</i> / <i>Lmx1b</i> ^{2loxP} / <i>P2.5-Cre</i> - Mäusen	48
2.2.5. Arbeit mit Proteinen	49
A) Aufbereitung von Mäuseurin	49
B) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
C) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
D) Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	53
3. Ergebnisse	54
3.1. Induktion von Nierenversagen durch Injektion von Anti-GBM-Serum	54
3.1.1. Entwicklung von Nierenversagen bei BL/6-Mäusen der Linie <i>Lmx1b ko</i>	54
3.1.2. Entwicklung von Nierenversagen bei JF1-Mäusen der Linie <i>Lmx1b ko</i>	60
3.1.3. Entwicklung von Nierenversagen bei BL/6-Mäusen der Linie <i>Lmx1b</i> ^{lox} x <i>P 2.5-Cre</i>	65

3.2. Induktion von Nierenversagen durch Injektion von LPS	66
3.3. Ausbildung eines Nierenschadens nach Implantation eines DOCA-Pellets und einer Angiotensin II-Pumpe bei uninephrektomierten Mäusen	67
3.4. Lebenserwartung für Mäuse verschiedener Genotypen aus der Linie <i>Rblox3</i> (926) x <i>Lmx1b</i> ^{lox} x P 2.5- <i>Cre</i>	68
3.5. Auswertung des Gen Chips Affymetrix Mouse Genome 430 2.0	75
3.5.1. Gene mit deutlicher Abnahme ihrer Expression	75
3.5.2. Gene mit deutlicher Zunahme ihrer Expression	82
4. Diskussion	90
4.1. Gesteigerte Empfindlichkeit konventioneller, nicht aber podozytenspezifischer <i>Lmx1b</i> Knock-out Mäuse gegen glomeruläre Schädigung mittels Anti-GBM Antikörpern	90
4.1.1. Vergleich des Anti-GBM-Serum Versuchs bei konventionellen <i>Lmx1b</i> Knock-out Mäusen verschiedener genetischer Hintergründe	90
4.1.2. Problematik der anderen nierenschädigenden Versuchsansätze bei konventionellen <i>Lmx1b</i> Knock-out Mäusen	93
4.1.3. Beobachtungen bei Mäusen mit konstitutiver podozytenspezifischer Inaktivierung von <i>Lmx1b</i>	94
4.2. Schlussfolgerungen aus den Überlebenskurven von Mäusen verschiedener Genotypen der Linie <i>Rb-lox3</i> (926) x <i>Lmx1b</i> ^{2loxP} x P2.5- <i>Cre</i>	95
4.2.1. Hinweise auf eine wechselseitige Beeinflussung von <i>Lmx1b</i> und <i>Rb</i>	95
4.2.2. Bedeutung der Insertion von <i>loxP</i> -Stellen	97
4.3. Potentielle Zielgene von <i>Lmx1b</i>	97
4.3.1. Zielgene aus dem Bereich des Immunsystems	97
4.3.2. Zielgene aus dem Bereich der Zelladhäsion und –motilität	99
4.3.3. Bedeutung von Microarrays	100
5. Zusammenfassung	102
6. Abkürzungsverzeichnis	104
6.1. Chemische Symbole	104
6.2. Länderabkürzungen	104
6.3. Andere	105
7. Literaturverzeichnis	115
8. Lebenslauf	135
9. Danksagung	136

1. Einleitung

1.1 Entwicklung, Aufbau und Funktion der Niere

1.1.1 Embryonale Entwicklung der Niere

Das Harn produzierende und Harn ableitende System entwickelt sich beim Menschen ab der vierten Woche aus Anteilen des intermediären Mesoderms, das den sogenannten nephrogenen Strang bildet und aus dem sich nacheinander die Vor-, Ur- und Nachniere entwickeln. Dabei ist die Vorniere nie funktionstüchtig und auch die Urniere scheidet nur kurzzeitig Harn aus, wohingegen sich aus der Nachniere die endgültige Niere entwickelt. Sie entsteht aus zwei separaten Anlagen: der vom Wolff-Gang aussprossenden Ureterknospe einerseits und aus dem die Ureterknospe umgebenden Mesoderm andererseits. Aus der Ureterknospe bilden sich der Ureter und das Nierenbecken mit Kelchen und Sammelrohren, während aus dem Mesoderm der Tubulusapparat und die Glomeruli entstehen. Die ursprünglich im kleinen Becken angelegten Nieren verlagern sich im Verlauf der Embryonalperiode weiter nach kranial. Mit ihrer Tätigkeit beginnen die Nachnieren in der 11. bis 13. Woche der Fetalperiode und regulieren das Volumen der Amnionflüssigkeit (Sökeland J, Rübben H: Taschenlehrbuch Urologie. Thieme Verlag, 2008).

1.1.2 Aufbau und Funktion der adulten Niere

A) Makroskopischer Aufbau

Eine adulte humane Niere wiegt zwischen 120 g und 200 g und ist retroperitoneal gelegen. Sie besitzt eine derbe Organkapsel (Capsula fibrosa), die von einer Fettschicht (Capsula adiposa) und dann wiederum von einer bindegewebigen Hülle (Fascia renalis) umgeben ist.

B) Mikroskopischer Aufbau

Die Grundbausteine der Niere sind die Nephrone, jeweils bestehend aus einem Nierenkörperchen und den Tubuli, von denen jede Niere etwa 1,2 Millionen besitzt. Das Nierenkörperchen wiederum besteht zum einen aus dem Glomerulus, einem Blutkapillarknäuel, und zum anderen aus der Bowman'schen Kapsel mit ihrem parietalen Blatt (einem einschichtigen, platten Epithel) und ihrem viszeralem Blatt, den Podozyten. Die beiden Blätter gehen im Bereich der Einstülpungsstelle des Glomerulus ineinander über. Die Podozyten sind ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen, sie umgreifen mit ihren

primären und sekundären Fußfortsätzen die Glomeruluskapillaren (s. Abb. 1) und bilden in den Spalträumen zwischen ihren Fortsätzen Schlitzdiaphragmen aus [Welsch U (Hrsg.): Lehrbuch Histologie. Urban und Fischer, 2003].

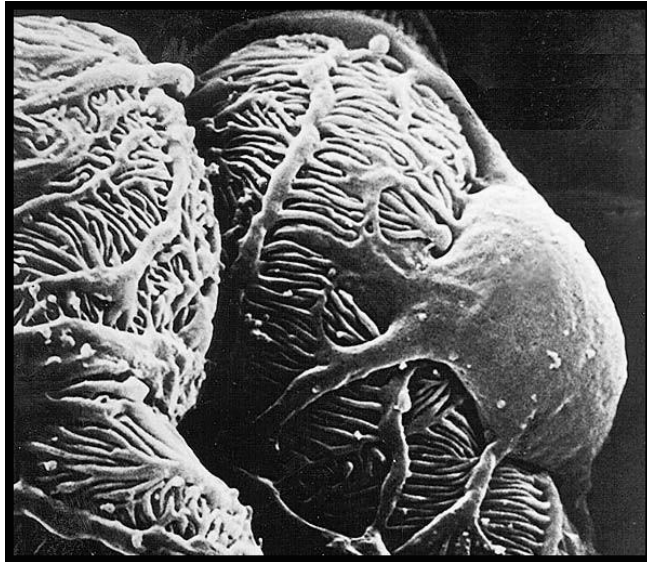


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulus. Die primären und sekundären Fußfortsätze der Podozyten umgreifen die Kapillarschlingen des Gefäßknäuels (aus Histonet2000.de).

Das Schlitzdiaphragma (Durchmesser ca. 25 bis 40 nm) mag man sich als modifizierte Zonula adhaerens vorstellen (Reiser J et al., 2000), denn tatsächlich enthält es für tight junctions bzw. für Zonulae adhaerentes typische Komponenten wie ZO-1 bzw. P-Cadherin (Schnabel E et al., 1990; Balda MS und Matter K, 2000). Die strukturelle und funktionelle Basis des Schlitzdiaphragmas bilden vermutlich interagierende Immunglobulin-ähnliche Domänen von Nephrin, einem Zelloberflächenrezeptor aus der Immunglobulin-Superfamilie (Lenkkeri U et al., 1999; Gerke P et al., 2003; Barletta GM et al., 2003). Über seine intrazelluläre Domäne ist es mit CD2AP und Podocin und darüber letztlich mit dem Zytoskelett assoziiert (Shih NY et al., 2001; Boute N et al., 2000; Yuan H et al., 2002). Neben Nephrin gibt es drei weitere, dem Nephrin ähnliche, transmembranäre Proteine, NEPH1, NEPH2 und Filtrin, die zur Struktur des Schlitzdiaphragmas beitragen (Holthöfer H, 2007). Ebenfalls von Bedeutung ist FAT1, ein Mitglied der Cadherin-Superfamilie, das vermutlich für das interzelluläre Adhäsionsnetzwerk und zur Sicherung des interzellulären Abstandes erforderlich ist. Außerdem spielt es eine zentrale Rolle in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts im Podozyten (Ciani L et al., 2003). Weiterhin mit dem Schlitzdiaphragma-Komplex assoziiert sind auch α -Actinin-4 und Densin (Holthöfer H, 2007) (s. Abb.2). Insgesamt ähnelt das elektronenmikroskopische Bild einem

Reissverschluss (Rodewald R et al., 1974). Gemeinsam bilden Schlitzdiaphragma, glomeruläre Basalmembran und Kapillarendothel die Filtrationsbarriere des Nierenkörperchens. Die glomeruläre Basalmembran entsteht durch Verschmelzung der Basallaminae von Podozyten und Endothelzellen der Kapillaren, sie wird in eine Lamina rara externa, eine Lamina densa und eine Lamina rara interna unterteilt. Wesentliche Bestandteile hier sind Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat und Fibronektin [Welsch U (Hrsg.): Lehrbuch Histologie. Urban und Fischer, 2003]. Da die Nierentubuli in dieser Arbeit nur von untergeordnetem Interesse sind, wird ihr Aufbau nicht näher besprochen.

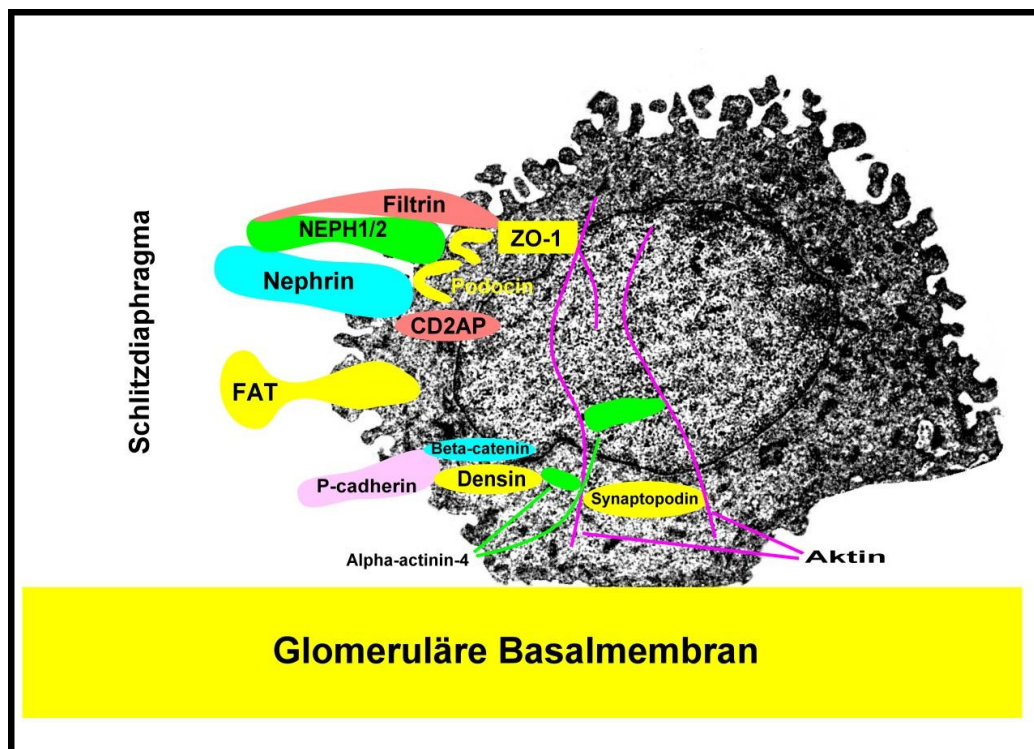


Abb. 2: Ultrastruktur des Schlitzdiaphragmas. Das Schlitzdiaphragma enthält typische Bestandteile von Adhäsionskomplexen wie ZO-1 und P-Cadherin. Die strukturelle Basis bildet aber vermutlich das Protein Nephtrin. Weitere wichtige Bestandteile des Schlitzdiaphragmas sind CD2AP, Podocin, NEPH1, NEPH2, Filtrin, FAT1, α -Actinin-4 und Densin (Grafik nach Holthöfer H, 2007).

C) Funktion der Niere

Die Nieren sind mit einem Blutfluss von 1,2 l/min stark durchblutet. Dieser Blutfluss wird zur Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsrate und damit der Primärharnbildung durch Autoregulationsmechanismen konstant gehalten. Die Primärharnbildung findet in den Nierenkörperchen durch Ultrafiltration statt, das Ultrafiltrat enthält alle Plasmabestandteile mit einem Molekulargewicht von unter 5 bis 10 kDa. Die Gesamtmenge des täglich auf diese Weise gebildeten Primärharns liegt bei etwa 170 l für einen erwachsenen Menschen, wovon allerdings 99% tubulär rückresorbiert werden. Dies gilt auch für die meisten im Filtrat enthaltenen Bestandteile. Über die Niere werden ferner harnpflichtige Substanzen und auch Medikamente ausgeschieden, ebenso wird der Säure-Basen-Haushalt in wesentlichen Teilen hier reguliert. Neben der Ausscheidungsfunktion besitzt die Niere auch endokrine Eigenschaften durch Bildung von Hormonen und Mediatoren wie Renin, Prostaglandinen, Kininen, Erythropoetin und Vitamin D₃ (Sökeland J, Rübber H: Taschenlehrbuch Urologie. Thieme Verlag, 2008).

1.2 Das Nagel-Patella Syndrom und seine Assoziation mit LMX1B

1.2.1 Klinische Symptomatik des Nagel-Patella Syndroms (NPS)

A) Allgemeine Symptomatik

Das Nagel-Patella Syndrom (OMIM 161200), auch bekannt als hereditäre Osteonychodysplasie, ist ein autosomal-dominant vererbtes Leiden mit einer Inzidenz von etwa 1 zu 50.000. Die Krankheit ist durch die klassische Tetrade aus Nagel-, Knie-, Ellbogen-, und Hüftfehlbildungen gekennzeichnet, aber auch die Nieren, die Augen und das muskuloskelettale System sind häufig mit betroffen (Sweeney E et al., 2003). Da diese Manifestationen sehr variabel in ihrer Ausprägung sind und es auch große inter- und intrafamiliäre Unterschiede gibt (Beals RK et al., 1969; Turner JW, 1933), wird die Krankheit oft über Generationen hinweg nicht diagnostiziert (Lucas GL et al., 1966).

Bei fast allen (98%) NPS-Patienten zu finden sind Nagelveränderungen, sei es, dass sie vollständig fehlen, hypoplastisch, dystroph, verfärbt, gespalten, verdünnt oder verdickt sind. Am stärksten betroffen ist zumeist der Daumnagel. Diese Veränderungen können von

einer eingeschränkten Beweglichkeit der Finger begleitet sein (Sweeney E et al., 2003). Etwas seltener, aber immer noch bei 74% der Patienten findet man eine oft asymmetrische Kniebeteiligung mit kleiner, verformter oder fehlender Patella (Guidera KJ et al., 1991; Carbonara P et al., 1964). Aufgrund der Deformitäten kommt es nicht selten zu Subluxationen und als Spätfolge zu degenerativen Arthritiden. Weitere, seltenere Symptome sind Fehlbildungen der Ellbogen, des Beckens, der Fußgelenke und Füße und andere skelettale Manifestationen. Vermutet werden auch Zusammenhänge mit der Glaukomerkrankung, gastrointestinalen und neurologischen Problemen (Sweeney E et al., 2003). Am bedeutsamsten jedoch ist die renale Manifestation, denn sie beeinflusst die Lebenserwartung der betroffenen Patienten.

B) Nierensymptomatik

Die Häufigkeit einer renalen Beteiligung wird je nach Autor mit 37,5% (Sweeney E et al., 2003) bis 55% (Bennett WM et al., 1973) angegeben, die des terminalen Nierenversagens mit 3% (Sweeney E et al., 2003) bis 5,5% (Bennett WM et al., 1973). Ein erstes Zeichen renaler Beteiligung ist häufig die Entwicklung einer Proteinurie mit oder ohne Hämaturie, die jahrelang asymptomatisch bleiben, aber auch rasch zum terminalen Nierenversagen fortschreiten kann (Hoyer JR et al., 1972; Vernier RL et al., 1974). Als Ursache wird ein Defekt der glomerulären Basalmembran angenommen (Gubler MC et al., 1980), wofür auch elektronenmikroskopische Befunde bei einigen Patienten sprechen: bei ihnen zeigte sich eine irreguläre Verdickung der glomerulären Basalmembran, kollagenartige Fibrillen (die normalerweise selbst unter dem Elektronenmikroskop nicht sichtbar sind), eine Vermehrung der mesangialen Matrix und ein Verschwinden von Fußfortsätzen der Podozyten (Bennett WM et al., 1973). Insgesamt ergibt sich der Eindruck einer gestörten glomerulären Filtrationsbarriere als Ursache der renalen Schädigung bei NPS-Patienten.

1.2.2 LMX1B

A) Die Struktur des „NPS-Gens“ LMX1B

Das NPS-Gen wurde auf 9q34, zwischen D9S60 und AK1 lokalisiert (McIntosh I et al., 1997) und schließlich durch Positionsklonierung als *LMX1B* identifiziert. Es ist aus acht Exonen zusammengesetzt, die transkribierte mRNA ist ca. 7 kb lang (Dreyer SD et al., 1998; Vollrath D et al., 1998). Durch alternatives Spleißen können zwei verschiedene mRNAs entstehen, wobei die funktionellen Unterschiede der beiden daraus synthetisierten Proteine von 372 und 379 Aminosäuren noch unklar sind (Seri M et al., 1999). Inzwischen ist bekannt, dass das zweite und dritte Exon je für eine LIM-Domäne kodieren, während die kodierende Sequenz für die Homeodomäne von LMX1B auf die Exone vier, fünf und sechs aufgeteilt ist (Dunston JA et al., 2004).

Was die 5' nicht-translatierte Region betrifft, so ist diese mit 1,3 kb aufwärts des Transkriptionsstartpunktes deutlich länger als die durchschnittlicher Wirbeltiergene (meist 90 bis 120 Nukleotide) (Meijer HA et al., 2002), die 3' nicht-translatierte Region ist etwa 4,6 kb lang (Dunston JA et al., 2004). Der Transkriptionsstartpunkt ist nicht mit einer TATA-Box assoziiert. Schließlich findet man noch zwei stromaufwärts gelegene offene Leserahmen, die vielleicht eine Rolle in der Translationskontrolle spielen, sowie ein in der 5' nicht-translatierten Region gelegenes Startcodon (Dunston JA et al., 2004).

B) Struktur und Funktion des Transkriptionsfaktors LMX1B

LMX1B gehört zur Familie der LIM-Homeodomäne-Transkriptionsfaktoren, die an einer Vielzahl von Vorgängen bei der Entwicklung der Körpergestalt beteiligt sind (Dawid IB et al., 1995; Curtiss J et al., 1998). LIM-Domänen enthalten zwei Cystein-reiche Zink-Finger Motive und nehmen an Protein-Protein-Interaktionen teil (Johnson JD et al., 1997; Jurata LW et al., 1997), während die Homeodomäne das FLAT-Element (TTAATAATCTAATTA) bindet (German MS et al., 1992; Dreyer SD et al., 1998; McIntosh I et al., 1998). Als mit den LIM-Domänen interagierende Proteine kennt man bisher im Wesentlichen LDB1, das die LMX1B-vermittelte Transaktivierung von Reportergenen vermindert, und das Protein E47/shPan1, das eher synergistisch mit LMX1B wirkt (Jurata LW et al., 1996; Agulnick AD et al., 1996; Bach I et al., 1997; German MS et al., 1992; Johnson JD et al., 1997). Unter den Funktionen von LMX1B

am bekanntesten ist seine Rolle bei der Ausbildung der dorsoventralen Differenzierung der Gliedmaßen (Chen H et al., 1998; Riddle RD et al., 1995; Vogel A et al., 1995; Cygan J et al., 1997). So wird die Expression von *Lmx1b* im Mesenchym der sich entwickelnden distalen Gliedmaßen durch Expression von *Wnt7a* im dorsalen Ektoderm induziert und durch *En1* im ventralen Ektoderm unterdrückt (Cygan J et al., 1997; Johnson RL et al., 1997). Darüber hinaus wirkt *Lmx1b* an der Entwicklung mesenzephaler dopaminerger Neurone mit und wird in der Substantia nigra und im ventralen Tegment stark exprimiert (Smidt M et al., 2000). In der Niere wird *Lmx1b* (in Mäusen) erstmals 13,5 Tage post conceptionem im S-förmigen Körper exprimiert, aus dem später der Glomerulus entsteht (Lechner MS et al., 1997), ab dem Tag 15,5 pc findet sich eine schwache Expression im Mesenchym um die aussprossenden Sammelrohre und eine starke Expression in den Glomeruli (Chen H et al., 1998). Postnatal ist die Expression von *Lmx1b* auf die Niere und das ZNS beschränkt (Dreyer SD et al., 1998; Smidt M et al., 2000).

C) Mutationen in *LMX1B* und der daraus resultierende Phänotyp

Bisher sind insgesamt 187 Mutationen in *LMX1B* bekannt, die aber alle die Symptomatik des Nagel-Patella Syndroms zeigen, egal ob eine Missense-, eine Nonsense-Mutation oder auch eine Deletion vorliegt, woraus folgt, dass das NPS vermutlich Resultat einer Haploinsuffizienz für *LMX1B* ist (Dunston JA et al., 2004). Die Mutationen sind in den LIM- und der Homeodomäne konzentriert (Clough MV et al., 1999; Bongers EM et al., 2002; Hamlington JD et al., 2001), wobei, abhängig von der Art der Mutation, noch eine residuelle Transaktivierungsfunktion des mutierten *LMX1B* verbleibt (Dreyer SD et al., 2000). Obwohl man davon eventuell dominant-negative Effekte des veränderten Proteins ableiten könnte, die auch die Unterschiede zum Phänotyp im Mausmodell (s. 2.2.4.A) erklären würden, konnten derartige Effekte bisher nicht nachgewiesen werden (Dreyer SD et al., 2000). Betrachtet man die für diese Arbeit vorrangig interessierenden Patienten, die eine Nephropathie entwickeln, so scheinen eine positive Familienanamnese für Nephropathien und Mutationen in der Homeodomäne von *LMX1B* besondere Risikofaktoren zu sein (Bongers E et al., 2005).

D) Tiermodelle für das Nagel-Patella Syndrom und ihre Problematik

Zur Erforschung des Nagel-Patella Syndroms wurden verschiedene Mausmodelle entwickelt, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden und alle ihre spezifischen Vorzüge und Nachteile besitzen.

1. Konventionelle *Lmx1b* Knock-out Mäuse

Diese Mäuse zeigen konstitutionell eine Deletion der Exone drei bis sieben von *Lmx1b*. Für diesen Defekt homozygote Mäuse sterben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt und zeigen eine gestörte Ausbildung der dorso-ventralen Differenzierung der Gliedmaßen: es finden sich keine dorsalen Haarfollikel, sondern stattdessen Fußballen, die Finger sind nicht nach ventral flektiert, Patella, Nägel und Ulna fehlen vollständig und die Skapula ist deformiert. An der Niere sieht man eine irreguläre Verdickung der glomerulären Basalmembran mit gelegentlichen Aussparungen (Chen H et al., 1998). Die Podozyten entwickeln keine Fußfortsätze mehr und sind auch nicht über Schlitzdiaphragmen verbunden (Miner JH et al., 2002; Rohr C et al., 2002). Darüber hinaus produzieren sie kein Podocin und keine $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Ketten von Kollagen Typ IV mehr (Miner JH et al., 2002; Rohr C et al., 2002; Morello R et al., 2001). Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Befunden in humanen Nierenbiopsien von NPS-Patienten, in denen sowohl Podocin als auch die $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Ketten von Kollagen Typ IV detektiert werden konnten (Heidet L et al., 2003). Ein weiteres Problem dieses Modells ist die Tatsache, dass heterozygote Tiere keinen, zumindest keinen offensichtlich auffälligen Phänotyp zeigen (Rohr C et al., 2002), was sich schlecht mit der humanen, autosomal-dominant vererbten Krankheit in Einklang bringen lässt. Als einzige Besonderheit der heterozygoten Tiere ist bisher bekannt, dass sie ein vermindertes kompensatorisches Wachstum der verbliebenen Niere nach Uninephrektomie im Vergleich zum Wildtyp zeigen (Endele S et al., 2007). Obwohl also der Phänotyp der homozygoten Knock-out Mäuse stark an das Nagel-Patella Syndrom erinnert, hat das Tiermodell doch einige Mängel, weshalb weitere Modelle entwickelt wurden, die in der Folge erläutert werden.

2. Konstitutive podozytenspezifische Inaktivierung von *Lmx1b*

Die konstitutive podozytenspezifische Inaktivierung von *Lmx1b* wird dadurch erzielt, dass Mäuse mit gefloxtem Allel für *Lmx1b* mit P2.5-Cre transgenen Mäusen verpaart werden. P2.5-Cre transgene Mäuse sind Träger einer Cre-Expressionskassette unter der Kontrolle des *NPHS2*-Promoters (humaner Podocinpromoter) und zeigen deshalb nur in den Podozyten Cre-Aktivität (Moeller MJ et al., 2003). Das gefloxt Allel der *Lmx1b*^{2loxP}-Mäuse wird durch Einfügen von *loxP*-Sequenzen jeweils oberhalb von Exon vier und sechs des Genes generiert (Suleiman H et al., 2007). Bei Kombination dieser beiden Mauslinien katalysiert Cre mit hoher Spezifität die Rekombination zwischen seinen Erkennungssequenzen (*loxP*) und bewirkt so die Deletion des von zwei *loxP*-Stellen flankierten DNA-Segments (Schönig K et al., 2002). Auf diese Weise erzeugte Mäuse mit konstitutiver, podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* überleben etwa zwei Wochen nach der Geburt und ähneln dem Erscheinungsbild des humanen Nagel-Patella Syndroms mehr als die konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäuse, da sie noch eine Expression der $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Ketten von Kollagen IV sowie von Podocin zeigen (Suleiman H et al., 2007), was mehr im Einklang mit den Befunden in humanem Nierengewebe steht. *Lmx1b*^{lox/lox}, Cre positive Mäuse entwickeln initial Podozytenfortsätze, verlieren sie aber im Verlauf wieder. Darüber hinaus zeigen sie eine fokal-segmentale Glomerulosklerose, eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und einen Verlust der Schlitzdiaphragmen (Suleiman H et al., 2007). Nachteilig an diesem Tiermodell ist die Tatsache, dass die Aktivität des *NPHS2*-Promoters vom Entwicklungs- bzw. Differenzierungsprogramm eines Organismus abhängt (Schönig K et al., 2002) und die Cre-vermittelte Rekombination damit zum Zeitpunkt der ersten Aktivierung des Promoters stattfindet, ohne dass von außen Einfluss darauf genommen werden kann. Weiterhin kann Cre auch pseudo-*loxP*-Stellen im Genom erkennen und zu unerwünschten Rekombinationen führen (Thyagarajan B et al., 2000; Schmidt EE et al., 2000). Dies wird naturgemäß umso wahrscheinlicher, je länger Cre exprimiert wird. Um die auch bei diesem Tiermodell ersichtlichen Mängel weiter auszugleichen, kann stattdessen auf das Modell der induzierbaren podozytenspezifischen *Lmx1b* Knock-out Mäuse zurückgegriffen werden.

3. Induzierbare podozytenspezifische *Lmx1b* Knock-out Mäuse

In dieser Linie kontrolliert ein 2.5 kbp Fragment des humanen Podocinpromoters die Expression von rtTA (reverse tetracycline-controlled transcriptional activator) und garantiert so seine nierenspezifische Expression. rtTA besteht aus einem mutierten Tetrazyklin-Repressorprotein und VP16, bindet *tetO* (*Tet operator sequence*; in der 5'-Region bestimmter Zielgene lokalisiert) und aktiviert die Transkription in Anwesenheit von Tetrazyklin (*Tet-on System*) im Gegensatz zu tTA, das in Abwesenheit von Tetrazyklin *tetO* bindet und die Transkription aktiviert (*Tet-off System*). Das bedeutet, dass es in Abwesenheit von Tetrazyklin zu keiner Expression rtTA-kontrollierter Gene kommt, während seine Anwesenheit zu einer sowohl zeit- als auch dosisabhängigen Expression der Gene führt (Shigehara TA et al., 2003). Auf diese Weise kann ein Transgen zum Beispiel in der Embryonalentwicklung unterdrückt oder aktiviert werden, um Entwicklungsprozesse zu erforschen, und auch die Höhe der transgenen Expression kann durch die Doxycyclindosis gesteuert werden, ebenso wie die gewünschte Zeitdauer. Dieses System kann zur Regulation der Expression von Cre-Rekombinase genutzt werden, wodurch eine induzierbare, podozytenspezifische Inaktivierung ermöglicht wird. Hierzu werden die Gene für Luciferase und Cre unter die Kontrolle eines bidirektionalen *Tet* operators gestellt. Die Luciferase-Aktivität kann nun als indirekter, nicht-invasiver Marker für den Expressionsstatus des Zielgenes (cDNA für Cre-Rekombinase) verwendet werden, da die beiden etwa im Verhältnis 1:1 exprimiert werden (Hasan MT et al., 2001). Durch Verpaarung mit Mäusen der Linie *Lmx1b*^{2loxP} entstehen triple-transgene Tiere mit einer induzierbaren, podozytenspezifischen Inaktivierung von *Lmx1b*, die von den hier aufgeführten Tiermodellen die meisten Vorteile bieten, da der Zeitpunkt des Ausschaltens von *Lmx1b* frei gewählt werden kann und durch kürzere Expressionszeiten der Cre-Rekombinase unerwünschte Rekombinationen weitaus unwahrscheinlicher sind. Als größter Nachteil ist aufzuführen, dass die Zucht triple-transgener Mäuse mühsam ist und dadurch Untersuchungen an größeren Fallzahlen erschwert sind. Es bleibt anzumerken, dass die Möglichkeit der Bestimmung der Luciferase-Aktivität in dieser Arbeit nicht genutzt wurde.

1.3 Retinoblastom – Klinische Bedeutung und Tiermodell

1.3.1 Struktur von pRB

Das Protein pRB besitzt nach bisherigen Erkenntnissen mindestens zwei Protein-bindende Taschen: die große A/B-Tasche, die mit E2F und den D-Typ Cyclinen interagiert und auch Ziel der viralen Onkoproteine von DNA-Tumoviren ist (Welch PJ und Wang JYJ, 1995; Hu Q et al., 1990; Kaelin WG et al., 1992), und die C-Tasche, die mit der nukleären c-Abl Tyrosinkinase in Verbindung tritt (Welch PJ und Wang JYJ, 1993) (s. Abb. 3).

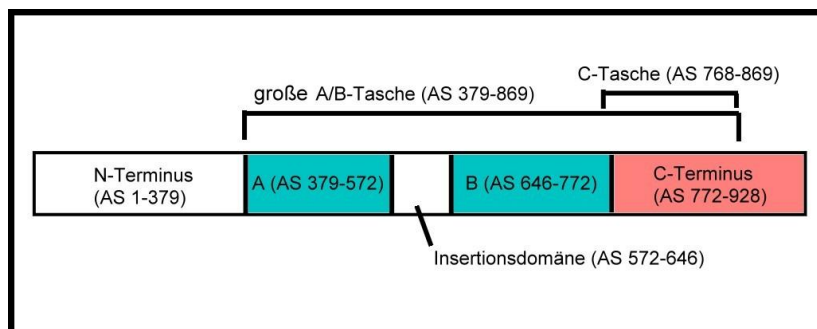


Abb. 3: Struktur von pRB. Die A/B-Tasche besteht aus der A-Domäne (AS 379-572) und der B-Domäne (AS 646-772), sie allein ist jedoch nicht in der Lage, das Zellwachstum zu unterdrücken. Hierfür ist zusätzlich ein Teil der carboxyterminalen Domäne erforderlich, sodass man eine große A/B-Tasche aus den Aminosäuren 379 bis 869 definiert hat. Die große A/B-Tasche interagiert unter anderem mit dem Transkriptionsfaktor E2F, die C-Tasche verbindet sich mit der Tyrosinkinase c-Abl. Trotz der Überlappung der großen A/B-Tasche und der C-Tasche können beide Taschen simultan Proteinbindungen eingehen (Grafik nach Welch PJ und Wang JYJ, 1995).

Die Mehrzahl der inaktivierenden Mutationen ist im Bereich der A/B-Tasche lokalisiert (Huang PS et al., 1993). Trotz der überlappenden Aminosäuresequenzen der beiden Taschen können sie simultan besetzt werden (Welch PJ und Wang JYJ, 1995).

1.3.2 Bedeutung des *Rb*-Gens

Das Retinoblastom-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, das an der Entstehung einer Vielfalt von Tumoren wie dem familiären Retinoblastom und Osteosarkom sowie dem sporadischen Lungen-, Prostata-, Blasen- und Mammakarzinom beteiligt ist (Goodrich DW et al., 1993). Hinzu kommen Funktionen in der Differenzierung von Neuronen, Muskelzellen, Fettzellen und Zellen der Retina (Khidr L und Chen PL, 2006), ebenso wie Funktionen in der Steuerung der Migration neuronaler Zellen (Ferguson KL et al., 2005). pRB besitzt zwei nahe verwandte

Proteine, p107 und p130, die den Verlust eines der Gene in gewissem Ausmaß kompensieren können (Sage J et al., 2000). Sie alle besitzen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus, speziell beim G1/S-Übergang (Weinberg RA, 1995). Normalerweise inhibiert pRB die Expression von Genen, die für den Eintritt in die S-Phase erforderlich sind, indem es direkt an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, bevorzugt E2F1 bis E2F4, bindet. Beim G1/S-Übergang wird pRB nach und nach durch Cyclin D/CDK4,6 und Cyclin E/CDK2-Komplexe phosphoryliert, wodurch E2F freigesetzt wird und seine Zielgene aktivieren bzw. reprimieren kann (Weinberg RA, 1995; Dyson N, 1998). Dies geschieht durch Heterodimerbildung der Transkriptionsfaktoren E2F1 bis E2F6 mit den DNA-Bindungsproteinen DP1 und DP2 (Cam H und Dynlacht BD, 2003), wobei E2F1 bis E2F3 eher als Aktivatoren und E2F4 und E2F5 eher als Repressoren der Transkription wirken. Die Funktion von E2F6 ist noch unklar (Khidr L und Chen PL, 2006). Neben dieser Funktion beim G1/S-Übergang scheint pRB auch von großer Bedeutung für den Vorgang der Zellalterung zu sein, für die es zwar viele Pfade gibt, die aber letztlich bei den Proteinen pRB und p53 zusammenzulaufen scheinen. In ruhenden Zellen ist pRB hypophosphoryliert, wodurch die E2F-Zielgene unterdrückt werden. Die Phosphorylierung wird durch CDK4-Inhibitoren, hier im Wesentlichen p21 und p16, verhindert. p16 und damit der p16-pRB-Pfad vermittelt vor allem die Zellalterung durch Stress wie Überexpression von Onkogenen und DNA-Schäden, während die Zellalterung bei Verkürzung der Telomere vor allem über den p53-p21-pRB-Pfad erfolgt (Zhang H, 2007). Ein Unterlaufen dieser Tumorsuppressionsmechanismen etwa durch Bindung viraler Onkogene an pRB kann folglich zur malignen Transformation einer Zelle führen (Zalvide J et al., 1995; Flint J et al., 1997; Smith-McCune K et al., 1999).

1.3.3 Tiermodelle zur Untersuchung der Funktionen der pRB-Proteinfamilie

Es gibt bereits verschiedene Untersuchungen über pRb, p107 und p130 in Mäusen. Es ist bekannt, dass *Rb*^{-/-} Embryos bereits intrauterin an den Folgen einer insuffizienten Erythropoese und eines anomalen Eintritts in den Zellzyklus mit Apoptose in Leber, Linse und im Zentralnervensystem versterben (Clarke AR et al., 1992; Jacks T et al., 1992; Lee EY et al., 1992). Embryonale Fibroblasten von triple Knock-out Mäusen (pRb, p107 und p130) zeigen einen kürzeren Zellzyklus und eine geringere Zellgröße im Vergleich zu Wildtypzellen. Darüber hinaus sind sie unempfindlich für G1-Arrest-Signale nach DNA-Schädigung oder

durch Kontaktinhibition. Auch weisen sie in Kultur keinen Alterungsprozess auf, dafür aber einige Charakteristika transformierter Zellen wie verankerungsunabhängiges Wachstum auf Agar (Sage J et al., 2000). Hier sind also einige Hinweise auf die Mitwirkung an der malignen Transformation von Zellen zu erkennen. Demgegenüber ist der Funktion von pRb in der Niere bisher kaum Beachtung geschenkt worden. Für diese spezielle Fragestellung bietet sich wieder die nierenspezifische Inaktivierung von *Rb* durch Verwendung des Cre-*loxP*-Systems (s. 1.2.2.D) an. Durch Verpaarung von Mäusen der Linie P2.5-Cre mit solchen der Linie *Rb-lox3* (926) erhält man Tiere, bei denen das Exon drei des *Rb*-Gens durch die Cre-Rekombinase in den Podozyten eliminiert wird. Sie ermöglichen zum einen die Untersuchung des Effekts dieser Deletion auf die Podozytenstruktur und -funktion, zum anderen können durch weitere Verpaarung mit Mäusen der Linie *Lmx1b*^{2loxP} an den daraus resultierenden Phänotypen etwaige funktionale Zusammenhänge der beiden Genprodukte pRb und Lmx1b beurteilt werden. Dies war ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit und wird später noch genauer erläutert werden.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Während das humane Nagel-Patella Syndrom durch eine Haploinsuffizienz für *LMX1B* verursacht und damit autosomal-dominant vererbt wird (Dunston JA et al., 2004), zeigen *Lmx1b*^{+/-} Mäuse keinen auffälligen Phänotyp (Rohr C et al., 2002) bis auf das verminderte kompensatorische Wachstum der verbliebenen Niere nach Uninephrektomie (Endele S et al., 2007). Ein wesentliches Ziel der Arbeit war deshalb, durch verschiedenartige Verfahren der Nierenschädigung wie Antikörperinjektion, Salzbelastung nach Uninephrektomie und LPS-Injektion doch noch ein andersartiges Verhalten der heterozygoten Tiere zu entdecken. Zur Unterscheidung nierenspezifischer und systemischer Funktionen von *Lmx1b* sollte der Versuchsablauf mit Tieren mit nierenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* wiederholt werden, ebenso wie mit konventionellen Knock-out Mäusen eines anderen Stammes (JF1) zum Ausschluss stammspezifischer Unterschiede.

Weiterhin ist bisher noch wenig darüber bekannt, welche Gene in den Podozyten einer Regulation durch *Lmx1b* unterliegen. Als Hinweis auf mögliche Kandidatengene sollte aus diesem Grund mittels Microarray die Veränderung von RNA-Expressionsspiegeln in isolierten Gomeruli nach podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* in adulten Mäusen untersucht werden.

Als ein mögliches mit *Lmx1b* funktionell wechselwirkendes Protein wurde pRb vermutet. Zur Verifizierung dieser Vermutung sollten Mäuse mit einer nierenspezifischen Inaktivierung beider Gene mit Tieren verglichen werden, bei denen nur eines der beiden Gene inaktiviert wurde. Bei deutlichen Diskrepanzen wären Rückschlüsse auf Interaktionen von pRb und *Lmx1b* bei Regulationsmechanismen im Podozyten möglich.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Acros, Geel, B
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, D
Angiotensin II human acetate	Sigma, München, D
Azur II	Fluka, München, D
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Serva, Amstetten, AU
BSA	Sigma, München, D
Complete Freund's Adjuvans	Sigma, München, D
Coomassie Blue R-250	Serva, Amstetten, AU
Deoxycorticosteronacetat (DOCA)	Innovative Research of America, Sarasota, USA
Deoxynukleosid-Triphosphat Set	Fermentas, St.Leon-Rot, D
DePex	Serva, Amstetten, AU
Di-Natrium-tetraborat x 10 H ₂ O p.a.	Merck, Darmstadt, D
Doxycyclin	Applichem, Darmstadt, D
Dynabeads® M-450-Epoxy	Invitrogen Dynal AS, Oslo, N
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Eosin G	Merck, Darmstadt, D

Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	J.T. Baker, Hazelwood, USA
Ethidiumbromid	Fluka, München, D
Ficoll 400	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt, D
Glutaraldehyd 25%	Serva, Amstetten, AU
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Hank's Balanced Salts Solution	Sigma, München, D
H ₃ BO ₃ / KCl / NaOH-Eichpuffer pH 9,0	Bernd Kraft, Duisburg, D
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm, Ulm, D
Histoacryl®	Braun Aesculap, Tuttlingen , D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ -Eichpuffer pH 7,0	VWR, Darmstadt, D
K ₂ S ₂ O ₅ (Kaliumdisulfit) p.a.	Merck, Darmstadt, D
Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Newmarket, GB
Ketamin 10%	WDT, Garben, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Kollagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III-Marker;	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Φ X 174 DNA <i>Bsu</i> I (<i>Hae</i> III)-Marker	

LPS (aus <i>E. coli</i>)	Sigma, München, D
Mayer's Hämlaunlösung	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methylenblau	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂	Fisher Scientific, Leicestershire, GB
N, N'-Methylenbisacrylamid (reinst)	Serva, Amstetten, AU
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Fisher Scientific, Leicestershire, GB
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O (Trinatriumcitratdihydrat)	Merck, Darmstadt, D
NaN ₃ (Natriumazid)	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Narcoren®	MERIAL, Hallbergmoos, D
Natriumdodecylsulfat	Serva, Amstetten, AU
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Paraplast® Plus Tissue Embedding Medium	Sherwood Medical, St. Louis, USA
Periodsäure p.a.	Merck, Darmstadt, D
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, D
Purified BSA 100x (10 mg/ml)	NEB, Frankfurt a. Main, D

Random Primers (500 µg/ml)	Promega, Madison, USA
Roti-Quant®	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	Merck, Darmstadt, D
Schiff's Reagenz	Roth, Karlsruhe, D
Sucrose	Merck, Darmstadt, D
Tätowierfarbe grün	Hauptner und Heberholz, Solingen, D
TEMED	Serva, Amstetten, AU
Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)	USB, Cleveland, USA
Xylazin 2%	Cp-Pharma, Burgdorf, D
Xylol	VWR, Darmstadt, D
α - ³² P-dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig, D

2.1.2 Enzyme

<i>Bam</i> H I: 100 U/µl	NEB, Frankfurt a. Main, D
Klenow DNA Polymerase: 5 U/µl	NEB, Frankfurt a. Main, D
Proteinase K (lyophilisiert)	Roth, Karlsruhe, D
Taq DNA Polymerase: 5 U/µl	NEB, Frankfurt a. Main, D

2.1.3 Kits

Nucleo Spin RNA II	Macherey-Nagel, Düren, D
--------------------	--------------------------

2.1.4 Genchips

Affymetrix Mouse Genome 430 2.0	Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik, Regensburg, D
---------------------------------	--

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Autoklavierband	VWR, Darmstadt, D
Cell Strainer 100 µm Nylon	BD Biosciences, Bedford, USA
Cellophan	Roth, Karlsruhe, D
Chromatographiepapier „3MM Chr“	Whatman, Dassel, D
Deckgläser für Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Drei-Wege-Hahn „Discofix C“	Braun, Tuttlingen, D
Einmal-Kanülen 21 G x 1 ½ '' (0,8 x 40 mm)	Braun, Tuttlingen, D
Einmal-Kanülen Neoleus 27 G x ¾ '' (0,4 x 20 mm)	Terumo, Leuven, B
Faden Terylene USP 2/0 DS-18, 24 x 50 cm	SERAG Wiessner, Naila, D
Glasobjektträger (7,6 x 2,6 cm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
Handschuhe Latex	Semperit, Wien, AU
Handschuhe Nitril	Roth, Karlsruhe / VWR, Darmstadt, D
Haushaltstücher	Fripa, Miltenberg, D
Histosette II® (zum Einbetten)	Simport, Beloeil, CA
Insulinspritze „BD Micro-Fine“	BD Medical, Heidelberg, D
Klarsichtfolien	Leitz, Stuttgart, D
Kreppband	Tesa, Hamburg, D
Küvetten (Plastik, 10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, D

Labortücher	Kimberly Clark, Neenah, USA
Mausbesteck	Braun, Tuttlingen/AF-Instrumente, Tuttlingen/FST, Bad Oeynhausen, D
Mikroosmotische Pumpe, Modell 1002, 0,25 µl/h, 14 d	Alzet, Cupertino, CA
Mikrotomklingen	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Mundschutz „Sekuroka“	Roth, Karlsruhe, D
Nylonmembran „Parablot NY plus“	Macherey-Nagel, Düren, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Paraflexformen	Vitri, Brattleboro, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Quarzküvette „Suprasil“	Hellma, Müllheim, D
Reaktionsgefäße (0,2 ml / 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Säulchen „MicroSpin S-200 HR“	GE Healthcare, München, D
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Silikonspray	Bauhaus Profi Depot, Mannheim, D
Skalpellsklingen	BAYHA, Tuttlingen, D
Spritzen (steril)	Braun, Tuttlingen, D
Sterilfilter (0,22 µm)	VWR, Darmstadt, D
Wattestäbchen	Goldhand, Düsseldorf, D

Zentrifugenröhrchen: 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen: 12 ml	Techno Plastic Products, Trasadingen, CH

2.1.6 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Dokumentations-System „Gel Max“	Intas, Göttingen, D
Agarose-Gelelektrophorese-Midisystem „Easy Cast“	Owl Scientific, Rochester, USA
Agarose-Gelelektrophorese-Minisystem „Horizon 58“	GIBCO BRL, Karlsruhe, D
Autoklav „Systec 5050 ELV“	Systec, Wettenberg, D
Autoklav „Varioklav Dampfsterilisator“	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Blutdruckmessgerät	Erka, Bad Tölz, D
Einbettautomat	Shandon-Elliott LTD, Runcorn, GB
Eismaschine „AF-10“	Scotsman, Vernon Hills, USA
Feinwaage	Kern, Balingen, D
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 20“	Zeiss, Göttingen, D
Fujifilm Phosphoimager FIA-5000	Fuji Film, Düsseldorf, D
Gefrierschränke bis -20°C	Privileg, Fürth, D
Gefrierschränke bis -80°C	Heraeus, Hanau, D
Heizblock „Bioblock Scientific“	Barnstead, Dubuque, USA
Heizblock „VLM LS 1“	VLM, Leopoldshöhe, D

Heizplatte	MEDAX, Kiel, D
Heizplatten mit Magnetrührer „MR 3001“	Heidolph, Kelheim, D
Imaging Plate 2025	Fuji Film, Düsseldorf, D
Inkubationsschrank „Kelvitron t“	Heraeus, Hanau, D
Kamera „DMC 2“	Polaroid, Minnetonka, USA
Kompressor „Jun air“	Jun-air, Ahrensburg, D
Kühlzentrifuge „Jouan BR 4“	Jouan, Saint Nazaire, F
Kühlzentrifuge „Sigma 3420“ mit Rotor Nr. 12154	Braun, Tuttlingen, D
Magnet zur Zellseparation „BD I Magnet“	BD Biosciences, Bedford, USA
„Mastercycler Gradient“	Eppendorf, Hamburg, D
Messgerät für Radioaktivität	Berthold, Bad Wildbach, D
Metabolische Käfige „MMC 100“	Hatteras Instruments, Cary, USA
Mikrotom „Leica RM 2255“	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D
Mikrowelle „Privileg 8018 E“	Privileg, Fürth, D
Netzgerät	Biometra, Göttingen, D
Paraffingießautomat „Leica EG 1150 H“	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick, Berlin, D
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	Integra Biosciences, Fernwald, D
Rotor „OV 3“	Bachofer, Reutlingen, D
Schüttler	Oehmen Labortechnik, Essen D
Schwanenhalslampe	Schott, Mainz, D

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System	Hoefer, Holliston, USA
„SE 600 Series Electrophoresis Unit“	
Spannungsgeber „Standard Power Pack P 25“	Biometra, Göttingen, D
Spektralphotometer „U-2000“	Hitachi, Krefeld, D
Stereomikroskop	Wild, Heerbrugg, CH
Stoppuhr	Macherey-Nagel, Düren, D
Thermomixer „5436“	Eppendorf, Hamburg, D
Thermostat „Polystat ccl“	Huber, Offenburg, D
Thermocycler „My Cycler“	Biorad, München, D
Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor	Heraeus, Hanau, D
„Sorvall 3329“	
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, D
Vortexer „Vortex Genie 2“	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage „RL 1500 S“	Sartorius, Göttingen, D
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, D
Wasseraufbereitungsanlage „Seralpur	Seral, München, D
PRO 90 CN“	

2.1.7 Software

Adobe Photoshop	Bildbearbeitung
File Maker Pro 6	Datenbanken
PASW Statistics 18	Erstellen von Kaplan-Meier-Kurven

Photo Impact 8	Bildbearbeitung
Image Pro Express	Bildverarbeitung am Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 20“
Microsoft Excel 2007	Erstellen von Diagrammen
Microsoft Word 2007	Textverarbeitung

2.1.8 Internetquellen

Pubmed	Literaturrecherche
OMIM	Recherche von Genloci

2.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide, ihre Namen sowie ihre Schmelztemperatur sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Name	Sequenz	Schmelztemperatur
<i>Cre</i> -F1	5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3'	60°C
<i>Cre</i> -R1	5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3'	60°C
<i>Lmx1b</i> (5'-lox)	5'-AGGCTCCATCCATTCTTCTC-3'	57°C
<i>Lmx1b</i> (3'-lox)	5'-CCACAATAAGCAAGAGGCAC-3'	57°C
<i>Rblox</i> P 5'	5'-CTCTACATCCTCTCATTCTTC-3'	55°C
<i>Rblox</i> P 3'	5'-CCTTGACCATAGCCCAGCAC-3'	55°C

Tab.1: Oligonukleotide. Bezogen wurden sie alle von der Firma Metabion, Martinsried, D.

2.1.10 Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien, eine kurze Beschreibung und ihre Herkunft sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Mauslinie	Beschreibung	Bezugsquelle
Konventionelle <i>Lmx1b</i> ko	Konstitutionelle Elimination von <i>Lmx1b</i> (Diese Mauslinie wurde sowohl auf dem Hintergrund von BL/6-Mäusen als auch von JF 1-Mäusen verwendet)	BL/6-Hintergrund: R. Johnson (MD Anderson Cancer Center, Houston, USA); JF1-Hintergrund: A. Winterpacht (Humangenetik, Univ. Erlangen, D)
<i>Lmx1b</i> ^{2loxP}	<i>loxP</i> -Stellen jeweils ober- und unterhalb von Exon 4 und 6	R. Johnson (MD Anderson Cancer Center, Houston, USA)
P2.5-Cre	Gen für Cre-Rekombinase unter der Kontrolle von 2.5 kbp des humanen <i>NPHS2</i> (Podocin) Promotors	L. Holzmann (University of Michigan, Ann Arbor, USA)
P2.5-rtTA	Gen für rtTA unter der Kontrolle von 2.5 kbp des humanen <i>NPHS2</i> (Podocin) Promotors	J. Kopp (NIH, Bethesda, USA)
LC-1	Luciferase- und Cre-Gene werden gemeinsam über einen bidirektionalen Tet Operator reguliert	H. Bujard (ZMBH, Heidelberg, D)
<i>Rb-lox3</i> (926)	<i>loxP</i> -Stellen ober- und unterhalb von Exon 3	T. Jacks (MIT, Cambridge, USA)

Tab. 2: Mauslinien. Bis auf die Ausnahme der *Lmx1b* ko-Linie wurden alle Linien auf dem BL/6-Hintergrund verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung von Mäusen

A) Präparation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Lösungen:

Tail buffer	100 mM Tris pH 8,0 5 mM EDTA pH 8,0 0,2 % SDS 200 mM NaCl
Proteinase K	lyophilisiert -> 20 mg in 1 ml H ₂ O lösen
Ethanol p.a. 70%	
Isopropanol p.a. 100 %	
1x TE – Puffer	10 mM Tris pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde den Mäusen ein 0,5 bis 1 cm langes Stück Schwanz abgeschnitten und die Blutung mit Histoacryl® gestillt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert, beziehungsweise für einen längeren Zeitraum bei -80°C aufgehoben. Anschließend wurde zu jeder Probe 700 µl Tail buffer und 7 µl Proteinase K zugegeben und der Ansatz über Nacht im Rotationsinkubator bei 9 rpm und 50°C inkubiert. Die derart behandelten Proben wurden 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit 700 µl Isopropanol überführt und kurz gevortext, um die DNA zu fällen. Die ausgefallene DNA wurde mit einer gelben Pipettenspitze in ein weiteres Reaktionsgefäß mit 500 µl 70% Ethanol überführt und 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden je nach Pelletgröße 120 – 150 µl TE-Puffer zugegeben und der Ansatz zum Lösen der DNA nochmals über Nacht bei 9 rpm und 50°C im Rotationsinkubator belassen. Zur DNA-Isolierung bei zwei bis drei Tage alten Mäusen wurden Proben von 3 bis 4 mm Länge verwendet, die Inkubationszeiten auf ca. 12 Stunden verkürzt und die DNA nur in 60 – 80 µl TE-Puffer aufgenommen.

B) Bestimmung der DNA-Konzentration

Lösungen:

1x TE-Puffer	s. auch 2.2.1 A
--------------	-----------------

Zur Ermittlung der Konzentration von aus Mäuseschwänzen isolierter DNA wurden 5 µl der gelösten DNA mit 95 µl TE-Puffer verdünnt und im Spektralfotometer „U-2000“ bei 260 nm in einer Quarzküvette vermessen. Als Leerwert diente 100 µl TE-Puffer. Der so gemessene Wert entsprach der DNA-Konzentration in der Einheit µg/µl.

C) Bestimmung des Genotyps mittels Polymerasekettenreaktion

1. Schritt: Durchführung der PCR

Lösungen:

10x Thermo Pol buffer	Endkonzentrationen im Reaktionsansatz: 20 mM Tris-HCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM KCl 2 mM MgSO ₄ 0,1% Triton X-100 pH 8,8 bei 25°C
MgCl ₂	25 mM
Primer 1, Primer 2	1 µg/µl
10 mM dNTPs	10 µl dATP (100 mM) + 10 µl dTTP (100 mM) + 10 µl dCTP (100 mM) + 10 µl dGTP (100 mM) + 60 µl H ₂ O
Taq Polymerase	5 U/µl

Die PCR wurde verwendet zum Nachweis des Gens für Cre-Rekombinase sowie zur Bestimmung des Genotyps bei *Lmx1b*^{2loxP}- und *Rb-lox3* (926)-Mäusen. Benutzt wurden dabei entweder der Thermocycler „MyCycler“ (Firma Biorad) oder „Mastercycler Gradient“ (Firma Eppendorf). Der Reaktionsansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl pipettiert:

DNA (aus Schwanzproben)	500 ng; entsprechend der Konzentration wurde ein passendes Volumen entnommen, bei einem Volumen von unter 1 µl wurde die DNA 1:10 vorverdünnt.
H ₂ O (autoklaviert)	38,4 µl – Volumen der DNA-Lösung
10x Taq buffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
Primer1, Primer2	je 0,3 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Taq Polymerase	1 µl
<hr/>	
	50 µl

Die PCR erfolgte nach unterschiedlichen Programmen für die unterschiedlichen Gene.

Für das Gen der Cre-Rekombinase:

Primer 1: *Cre* F1, Primer 2: *Cre* R1

Programm:	I.	3 min bei 94°C
	II. 1.	30 s bei 94°C
	2.	1 min bei 60°C
	3.	2 min bei 72°C
	III.	5 min bei 72°C

IV. Halten bei 4°C

Der Punkt II wird 35 Mal wiederholt. Die erwartete Bande nach Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.1.C, Schritt 2) hat ein Molekulargewicht von 290 bp (s. Abb. 1)

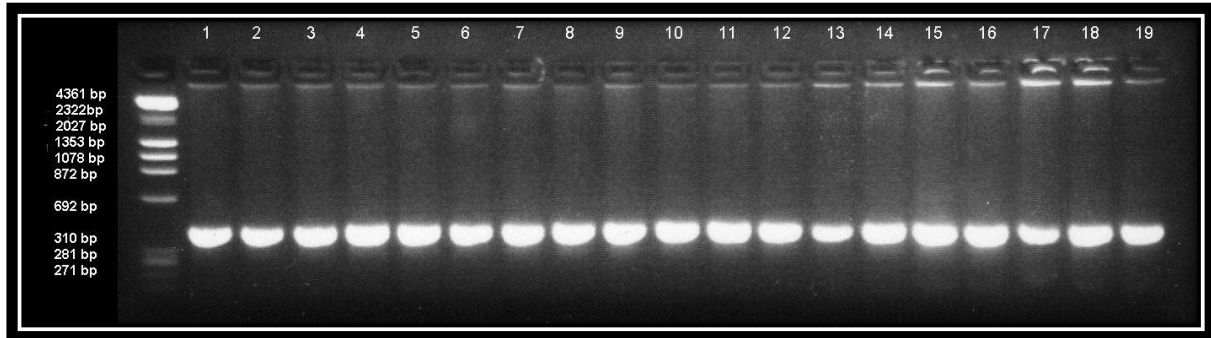


Abb. 1: PCR-Banden nach Genotypisierung auf Cre-Rekombinase. Eine Bande bei 290 bp zeigt das Vorhandensein des Gens an. In diesem Fall waren alle Proben positiv.

Für das *Lmx1b*-Gen:

Primer 1: *Lmx1b* (5'-lox), Primer 2: *Lmx1b* (3'-lox)

Programm: I. 5 min bei 94°C

II. 1. 45 s bei 94°C

2. 45 s bei 57°C

3. 45 s bei 72°C

III. 5 min bei 72°C

IV. Halten bei 4°C

Der Punkt II wird 35 Mal wiederholt. Die erwarteten Banden liegen für das Wildtypallel bei 220 bp, für das gefloxt Gen bei 330 bp (s. Abb. 2).

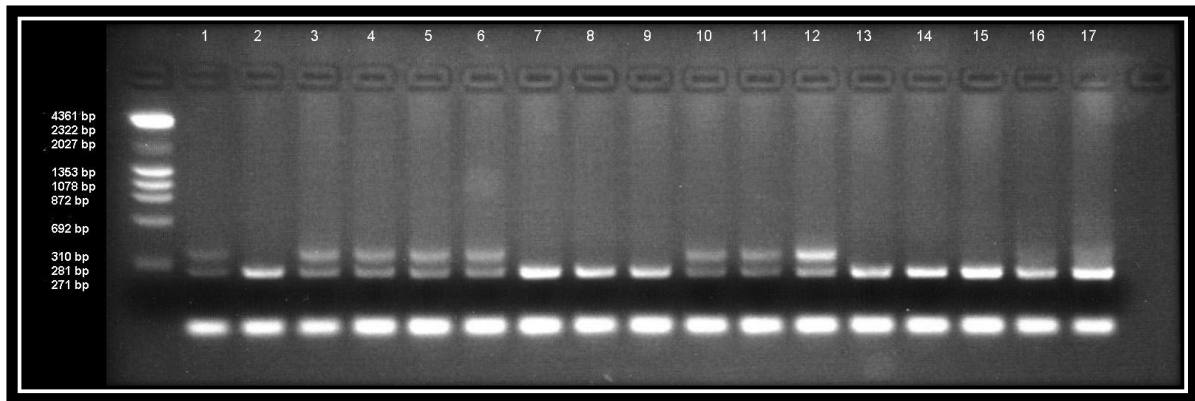


Abb. 2: PCR-Banden nach Genotypisierung auf *Lmx1b*^{2loxP}. Die Mäuse 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12 zeigen einen heterozygoten Genotyp, alle anderen sind homozygot Wildtyp.

Für das *Rb*-Gen:

Primer 1: *Rblox* P5', Primer 2: *Rblox* P3'

- Programm:
- I. 3 min bei 94°C
 - II. 1. 30 s bei 94°C
 - 2. 55 s bei 55°C
 - 3. 10 s bei 72°C
 - III. 5 min bei 72°C
 - IV. Halten bei 4°C

Der Punkt II wird 35 Mal wiederholt. Die erwartete Bande für das Wildtypallel liegt bei 260 bp, für das gefloxe Gen bei 308 bp (s. Abb. 3).

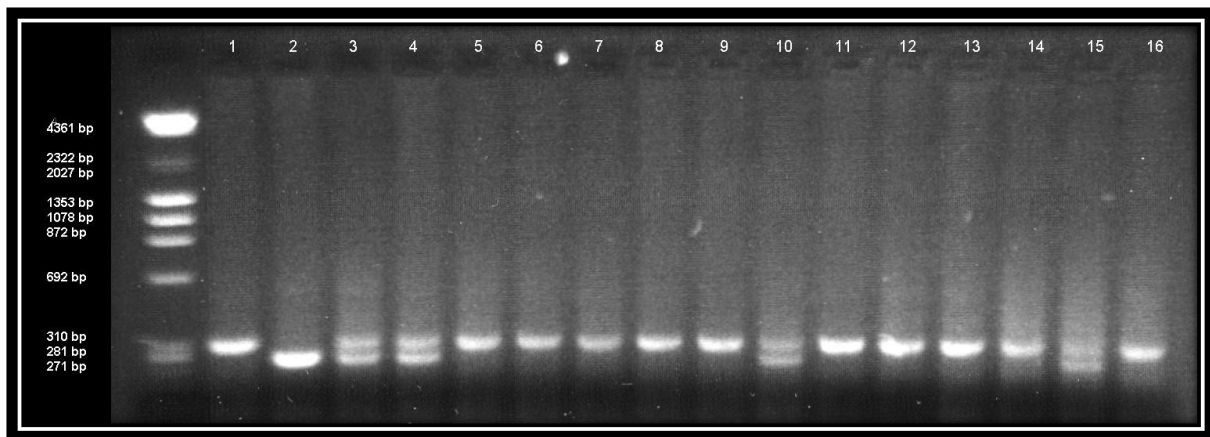


Abb. 3: PCR-Banden nach Genotypisierung auf *Rb-lox3* (926). Die Mäuse 1, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16 sind homozygote Träger des geflochten Gens, die Mäuse 3, 4, 10, 15 sind heterozygot, Maus 2 ist homozygot Wildtyp.

2.Schritt: Nachweis von DNA-Banden mittels Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

50x TAE-Puffer	2 M Tris 0,1 M EDTA Mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
Ethidiumbromid	1 mg/ml in H ₂ O lösen
5x Probenpuffer	15% Ficoll Typ 400 50 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS 0,125% Bromphenolblau
Molekulargewichtsstandard	40 µl Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker (0,5 mg/ml) + 40 µl ΦX 174 DNA/ <i>Bsu</i> RI (<i>Hae</i> III) Marker (0,5 mg/ml) + 400 µl 5x Probenpuffer; auffüllen auf 2 ml mit H ₂ O

Je nach Anzahl der Proben wurde das Minisystem „Horizon 58“ für 8 Proben oder das Midisystem „Easy cast“ für 20 bzw. bei Verwendung von zwei Kämmen für 40 Proben

verwendet. Zur Analyse von PCR-Reaktionen wurden 2%ige Agarose-Gele benutzt, zur Auftrennung von mit *BamH* I verdauter genomischer DNA (s. 2.2.1.D Schritt 1) 1%ige Gele. Die Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer aufgekocht, kurz abgekühlt, dann erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml. Die entstandene Lösung wurde möglichst blasenfrei in die Gelsysteme gegossen und für ca. eine halbe Stunde zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE-Puffer verwendet. Von den zu analysierenden PCR-Produkten wurden 5 µl Probe und 5 µl 2x Probenpuffer (durch Verdünnung von 5x Probenpuffer erhalten) gemischt, kurz abzentrifugiert und dann zusammen mit 10 µl des Molekulargewichtstandards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V bei den kleinen Gelen bzw. bei 150 V bei den größeren. Abschließend wurden die Banden mittels des Geldokumentationssystems unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert.

D) Bestimmung des Genotyps mittels Southern Blot

Dieses Verfahren wurde verwendet zum Nachweis des Genes für Cre-Rekombinase sowie für die cDNA rtTA und bei *Lmx1b* Knock-out Mäusen.

1.Schritt: Restriktionsverdau von DNA

Lösungen:

<i>BamH</i> I	100 U/µl
10x <i>BamH</i> I-Puffer	Endkonzentrationen im Reaktionsansatz:
	50 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM Dithiothreitol
	pH 7,9 bei 25°C
100x BSA	100 µg/ml BSA

5x Probenpuffer

s. 2.2.1.C Schritt 2

10 µg DNA wurden auf ein Volumen von 20 µl verdünnt und dann 1 µl *Bam*H I, 3 µl 10x *Bam*H I-Puffer, 0,1 µl 100x BSA und 5,9 µl H₂O zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, dann mit 7,5 µl 5x Probenpuffer vermischt, kurz abzentrifugiert und auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe 2.2.1.C Schritt 2) aufgetragen. Eine Positivkontrolle wurde stets mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt, bis das Bromphenolblau etwa die Mitte des Gels erreicht hatte. Zur Kontrolle wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und abfotografiert.

2.Schritt: Denaturierung und Neutralisierung

Lösungen:

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl
	0,5 M Tris HCl pH 7,2
	1,0 mM EDTA pH 8,0
	Mit Salzsäure auf pH 7,0 einstellen
20x SSC	3 M NaCl
	0,3 M Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O
2x SSC	1:10 verdünnt aus 20x SSC

Das Gel (s. 2.2.1.D Schritt 1) wurde in eine Glasschale gelegt und bei Raumtemperatur 45 min in Denaturierungslösung, anschließend 45 min in Neutralisierungslösung und zum Schluss 15 min in 2x SSC geschwenkt.

3.Schritt: Aufbau eines Southern Blots

Lösungen: s. 2.2.1.D Schritt 2

Als unterste Schicht diente Chromatographie-Papier „3MM Chr“, das an beiden Enden in 20x SSC eintauchte (s. Abb. 4). Darauf wurde das Gel seitenverkehrt aufgelegt. Die weiteren Schichten bestanden aus einer Nylonmembran und drei weiteren Lagen Chromatographie-Papier, die alle zuvor kurz in 2x SSC getaucht und dann möglichst blasenfrei aufgelegt wurden. Darauf wurde ein ca. 20 cm hoher Stapel Küchentücher gelegt und mit einem Gewicht beschwert. Der Blot wurde über Nacht belassen. Am nächsten Morgen wurde die Membran etwa 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, danach 2 h bei 80°C „gebacken“.

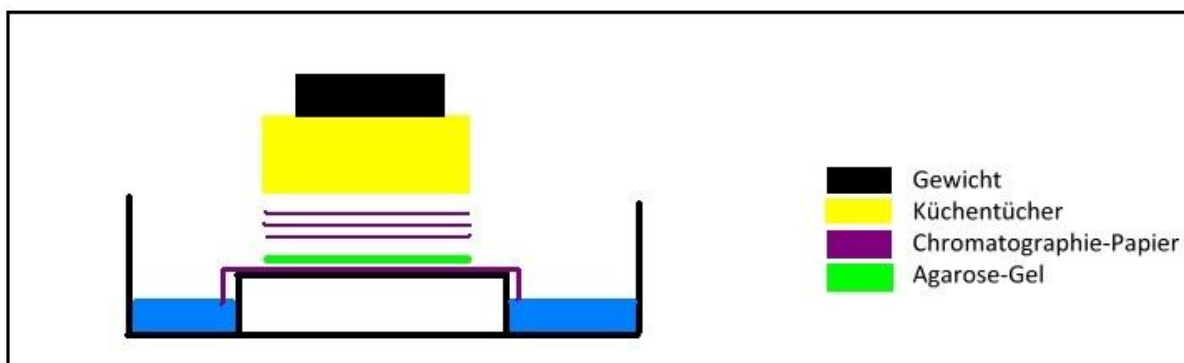


Abb. 4: Aufbau eines Southern Blots. Eine Lage Chromatographiepapier taucht beidseits in 20x SSC (blau in der Grafik). Darauf liegt umgekehrt das Gel, erneut 3 Lagen Chromatographiepapier und abschließend ein beschwerter Stapel Küchentücher.

4.Schritt: Hybridisierung und Random Priming

Lösungen:

Hybridisierungslösung	5% SDS
	1% BSA
	1 mM EDTA pH 8,0
	25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2
	100 mM NaCl
1x TE-Puffer	s. 2.2.1.A

In einem Hybridisierungsröhrchen wurde die Membran mit ca. 20 ml Hybridisierungslösung bei 60°C unter dauernder Rotation 3 Stunden inkubiert.

In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung der radioaktiven Sonde:

1. 2 µl Sonden-DNA (100ng/µl) (am Lehrstuhl aus Plasmiden durch Restriktionsverdau und Aufreinigung hergestellt)
2. 1 µl Random Primer (60 ng/µl)
3. 7 µl H₂O
4. 5 min bei 100°C inkubieren, dann auf Eis stellen
5. 2 µl 10x Klenow Puffer
6. 2 µl 0,5 mM d(GAT)TP
7. 5 µl α-³²P-dCTP
8. 1 µl Klenow Fragment
9. Ansatz 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

Nach Ablauf der drei Stunden wurde der Reaktionsansatz von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Verwendet wurden hierfür die Säulchen Micro Spin Column S-200 HR (Firma GE Healthcare):

1. Säulchen kurz vortexen, unteren Teil abbrechen
2. Säulchen 1 min bei 2.700 rpm zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
3. Radioaktive Sonde und 30 µl 1x TE-Puffer auf die Säule geben, 2 min bei 2.700 rpm zentrifugieren
4. Durchfluss 5 min bei 100°C inkubieren, dann nochmals kurz abzentrifugieren

Die fertige Sonde wurde mit frischer Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 60°C unter dauernder Rotation inkubiert.

5.Schritt: Waschen der Membran und Detektion des radioaktiven Signals

Lösungen:

2x SSC	s. 2.2.1.D Schritt 2
0,2x SSC / 0,1% SDS	aus 2x SSC und 20% SDS herstellen

Die Membran wurde nach folgendem Protokoll gewaschen:

1. 3 Mal 20 min bei 60°C in 2x SSC
2. 2 Mal 10 min bei 60°C in 0,2x SSC / 0,1% SDS
3. 1 Mal 5 min bei Raumtemperatur in 2x SSC

In Cellophan eingewickelt wurde die Membran über Nacht auf die Imaging Plate 2025 (Fuji Film) aufgelegt und am nächsten Tag mit dem Fujifilm Phosphoimager FIA-5000 eingescannt.

2.2.2 Perfusion von Mäusen und Weiterverarbeitung der perfundierten Nieren

A) Perfusion für Licht- und Elektronenmikroskopie

Lösungen:

1x PBS	<p>für 1 l:</p> <p>0,2 g KCl</p> <p>0,24 g KH_2PO_4</p> <p>8 g NaCl</p> <p>1,44 g Na_2HPO_4</p> <p>pH auf 7,4 einstellen</p>
4% PFA / 1x PBS	<p>für 1 l:</p> <p>40 g Paraformaldehyd bei ca. 70°C in 800 ml H_2O lösen (dazu mit 1 M NaOH einen pH-Wert von ungefähr 10 einstellen). Danach pH mit 1 M HCl wieder auf 7,0 einstellen. 100 ml 10x PBS zugeben, mit H_2O auf 1 l auffüllen.</p>

Lösung abschließend noch filtrieren.	
2% GA / 1x PBS	25% Glutaraldehyd mit 1x PBS auf 2% verdünnen
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	5.000 IE/ml; 1:4 verdünnen mit 0,9% NaCl auf eine Endkonzentration von 1.250 IE/ml
Narcoren	160 mg/ml; 1:50 mit 0,9% NaCl verdünnen
70% Ethanol	aus 100% Ethanol herstellen
0,02% NaN ₃ / 1x PBS	10% NaN ₃ mit 1x PBS verdünnen

Zunächst wurden die Mäuse mit 600-900 µl Narcoren anästhesiert und über Klebebänder an den Pfoten fixiert. Der Bauch wurde mit 70% Ethanol eingesprüht, dann der Bauchraum eröffnet und die Vena cava inferior und Aorta abdominalis dargestellt. Nachfolgend wurden die beiden Arteriae iliacae möglichst weit distal sowie die Aorta möglichst weit proximal (aber distal der Nierenarterien) abgeklemmt, ein Faden unter Aorta und Vena cava durchgezogen und locker verknotet. Durch ein kleines, in die Aortenvorderwand unmittelbar oberhalb der Bifurkation geschnittenes Loch wurde die Spitze eines ca. 30 cm langen, mit Heparin gefüllten Schlauches eingeführt (der Schlauch war auf eine mit Heparin gefüllte Spritze gesteckt) und der Knoten des Fadens fest gezogen. Danach wurde in die Vena cava oberhalb des Knotens ein Loch geschnitten, der Heparin-Schlauch kurz hinter der Spritze abgeschnitten und auf den mit 4% PFA / 1x PBS gefüllten Perfusionsschlauch gesteckt. Dieser war mit einem Kompressor verbunden. Nun wurde die Klemme auf der Aorta entfernt und die Maus 3 min bei etwa 0,22 bar perfundiert. Es folgte die Entnahme beider Nieren, wobei jeweils eine Hälfte in ein Gefäß mit 4% PFA / 1x PBS (zur Paraffineinbettung) bzw. ein Gefäß mit 2% GA / 1x PBS (für die Elektronenmikroskopie) gegeben wurde. Die Nierenhälften wurden in diesen Lösungen zwei Tage bei 4°C gelagert und danach zur weiteren Aufbewahrung in 0,02% NaN₃ / 1x PBS umgelagert.

B) Präparation von Mäusenieren für die Lichtmikroskopie

Lösungen:

1x PBS	s. 2.2.2.A
Isopropanol	reinen Isopropanol mit H ₂ O nach Bedarf verdünnen
Paraplast	Verwendung bei 60°C
Xylol	
Richardson-Färbelösung	<p>Lösung A: 1% Borax-Lösung (1 g Di-Natrium-tetraborat x 10 H₂O p.a. in 100 ml H₂O lösen); 1% Methylenblau</p> <p>Lösung B: 1% Azur II (Mallory's Azur)</p> <p>Lösung A und B bei Bedarf 1:1 mischen und filtrieren</p>

Der erste Teil der Präparation erfolgte bei 4°C. Dafür wurde zunächst jede Nierenhälfte in einen kleinen Gitterkäfig gegeben und alle Käfige gemeinsam in ein Becherglas gestellt, in das nun entsprechend dem Protokoll verschiedene Lösungen gegeben wurden. Das Becherglas wurde durch einen Schüttler andauernd leicht bewegt:

1. 2 Mal 1 Stunde in 1x PBS
2. 1 Stunde in 50% Isopropanol
3. Über Nacht in 70% Isopropanol

Am nächsten Morgen wurde der Einbettautomat (Firma Shandon-Elliott) für die weitere Einbettung, ab jetzt bei Raumtemperatur (Ausnahme: Schritt 6), programmiert:

1. ½ Stunde in 70% Isopropanol
2. 1 Stunde in 80% Isopropanol
3. 2 Mal 1 Stunde in 96% Isopropanol
4. 3 Mal 1,5 Stunden in 99% Isopropanol
5. 2 Mal 1 Stunde in Xylol

6. 3 Mal 4 Stunden in Paraplast (bei 60°C).

Anschließend wurden die Nierenhälften je in ein Abteil einer Paraflexform (Vitri®) gelegt und mit dem Automaten Leica EG 1150H in Paraffin gegossen. Mit einem Spatel wurde die Schnittfläche der Nieren nach unten gekehrt. Zum Aushärten wurden die Formen über Nacht bei 4°C gelagert und am folgenden Tag auf kleine Holzklötzchen aufgeschmolzen. Diese wurden in das Mikrotom eingespannt und 7 µm dicke Scheiben abgeschnitten. Die Schnitte wurden so lange verworfen, bis mutmaßlich ein kompletter Querschnitt der Niere enthalten war. Dieser Schnitt wurde in eine Glasschale mit ca. 40°C warmen Wasser gegeben, um ihn zu glätten, danach wurde er auf einen Objektträger aufgezogen, kurz angetrocknet und mit einem Tropfen Richardson-Färbelösung probegefärbt. Der gefärbte Schnitt wurde unter dem Mikroskop auf Vollständigkeit beurteilt und im positiven Fall wurden 7 weitere Schnitte genommen, im Wasserbad geglättet und auf Objektträger aufgezogen. Um sie auf den Objektträgern zu fixieren, wurden sie ein bis zwei Tag im Brutschrank bei 37°C belassen.

C) Präparation von Mäusenieren für die Elektronenmikroskopie

Die Einbettung der Nierenhälften in Epon sowie das Schneiden und Kontrastieren der Blöcke wurde von Karin Schadendorf vorgenommen, die Beurteilung unter dem Elektronenmikroskop von Christine Meese und Helga Schmidt.

D) HE-und PAS-Färbung von Paraffinschnitten

Zur besseren Beurteilung der Paraffinschnitte wurde jeweils sowohl eine HE- als auch eine PAS-Färbung durchgeführt.

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erscheinen Kerne blauviolett, das Zytoplasma ist rot, Ribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum blauviolett. Kollagenfasern werden rot angefärbt, elastische Fasern sind ungefärbt bis rosa.

Mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion können kohlenhydrathaltige Komponenten wie Glykoproteine, Schleime und Glykogen rot-violett angefärbt werden [Welsch (Hrsg.), Lehrbuch Histologie, 2003].

HE-Färbung:

1. Entparaffinieren: 2 Mal 10 min in Xylol
 - 2 Mal 2 min in 100% Isopropanol
 - 2 min in 96% Isopropanol
 - 2 min in 80% Isopropanol
 - 2 min in 70% Isopropanol
2. 2 min hydrieren mit H₂O
3. 3 min in Mayer's Hämalaun
4. 2 s in 0,1% HCl / 70% Ethanol
5. 10 min unter fließendes Leitungswasser
6. 3 min in 0,5% Eosin G (in Aqua bidest) + 3 Tropfen Eisessig (bei einem Volumen von 100 ml)
7. 3 s mit H₂O spülen
8. Dehydrieren: 3 s in 70% Isopropanol
 - 3 s in 80% Isopropanol
 - 2 min in 96% Isopropanol
 - 2 Mal 2 min in 100% Isopropanol
 - 2 Mal 10 min in Xylol
9. Mit Depex eindeckeln und 3 bis 4 Tage bei Raumtemperatur trocknen lassen.

PAS-Färbung:

1. Entparaffinieren: 2 Mal 10 min in Xylol
 - 2 Mal 1 min in 100% Isopropanol
 - 2 Mal 1 min in 96% Isopropanol
 - 1 min in 80% Isopropanol
 - 1 min in 70% Isopropanol
 - 1 min in H₂O
2. 10 min in 1% Periodsäure
3. 3 Mal kurz in H₂O spülen
4. 15 min in Schiff's Reagenz

5. 3 Mal 1 min in 1 g $K_2S_2O_5$ + 100 ml H_2O + 10 ml 1 M HCl
6. 5 min mit Leitungswasser spülen
7. Kurz in 0,1% HCl / 70% Ethanol tauchen
8. 5 min mit Leitungswasser spülen
9. Dehydrieren: 3 min in 70% Isopropanol
 - 3 min in 80% Isopropanol
 - 3 min in 96% Isopropanol
 - 3 min in 100% Isopropanol
 - 2 Mal 5 min in Xylol
10. Mit Depex eindeckeln und 3 bis 4 Tage bei Raumtemperatur trocknen lassen.

Für die Färbungen wurden die Objektträger mit den zu färbenden Schnitten in einen Glasträger gesteckt, der von einem Färbebecken in das nächste gehoben werden konnte. Um Verschiebungen zu vermeiden, wurden die eingedeckelten Schnitte erst nach Ablauf von drei bis vier Tagen unter dem Mikroskop Axioskop 20 (Zeiss) betrachtet und bei 20-facher Vergrößerung mit der Kamera DMC-2 (Polaroid) abfotografiert. Da auf diese Weise bis zu 5 Aufnahmen erforderlich waren, um den gesamten Schnitt zu erfassen, wurde ein Gesamtbild aus den sich überlappenden Einzelbildern rekonstruiert.

2.2.3 Glomerulipräparation und RNA-Isolation

A) Induktion von rtTA/LC1/*Lmx1b*^{2loxP}-Mäusen

Lösungen:

Doxycyclin	2 mg/ml [in 5% Sucrose (w/v) lösen]
5% Sucrose (w/v)	5 g Sucrose in 100 ml H_2O lösen

Es wurden weibliche Mäuse des Genotyps rtTA positiv, Cre positiv, *Lmx1b*^{lox/lox}, bzw. als Kontrolle auch vom Genotyp rtTA positiv, Cre positiv, *Lmx1b*^{+/-lox} verwendet. Die Mäuse erhielten in einer braunen Trinkflasche eine Lösung mit 2 mg/ml Doxycyclin und 5% Sucrose,

die Flasche wurde 2 Mal wöchentlich durch eine neue ersetzt. Die Mäuse wurden an den Tagen 0 (= Kontrolle), 1, 3, 5, und 7 perfundiert (s. 2.2.3.B) und ihre Nierenglomeruli isoliert.

B) Perfusion für die magnetische Isolation von Glomeruli

Das Vorgehen folgte weitgehend der Beschreibung des Skripts „Magnetic Isolation of Murine Kidney Glomeruli for Transcript-Profiling and Proteomic Analysis by Perfusion with Paramagnetic Beads“ von Andreas Bluthke (Department of Experimental and Molecular Pathology, LMU München).

Lösungen:

Puffer A1	19 ml 1 M NaH_2PO_4 + 81 ml 1 M Na_2HPO_4 ->auffüllen auf 1 l, pH auf 8,0 einstellen
1x PBS	s. 2.2.2.A
Lösung zum Blockieren der Beads	5 mg BSA pro ml Puffer A1
Narcoren 1:50	s. 2.2.2.A
Dynabeads M-450 Epoxy	Durchmesser der Beads 4,5 μm ; 4x 10 ⁸ Beads/ml

1.Schritt: Waschen der Beads:

- Bead-Suspension 1-2 min vortexen
- 2 μl der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und 1 min am Magneten platzieren
- Puffer abpipettieren, Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen und 1 ml Puffer A1 hinzufügen
- Reaktionsgefäß 2 min vortexen, dann erneut 1 min am Magneten platzieren
- Puffer abpipettieren, Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen und 200 μl Puffer A1 hinzufügen

2. Schritt: Blockieren der Beads:

- Gewaschene Beads 1 min vortexen, dann 200 µl Blockierungslösung hinzufügen
- Bei Raumtemperatur 16-20 Stunden (über Nacht) unter langsamer Rotation im Karussell belassen
- Reaktionsgefäß 1 min am Magneten platzieren
- Puffer abpipettieren, Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen
- 200 µl 1x PBS hinzufügen
- Reaktionsgefäß 1 min vortexen und für 1 min am Magneten platzieren
- Puffer abpipettieren und Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen
- Die drei letzten Schritte drei Mal wiederholen

3. Schritt: Herstellung der Perfusionslösung:

- Blockierte Beads (200 µl) zu 40 ml 1x PBS (auf 40°C erhitzt) hinzufügen
- 1 min vortexen

4. Schritt: Perfusion:

Das Reservoir für die Perfusionslösung wurde aus einem 50 ml Zentrifugenröhrchen, einer Kanüle und einem Schlauch selbst hergestellt. Die Kanüle wurde in die Spitze des Zentrifugenröhrchens eingeklebt, der Schlauch durch ein Loch im Deckel geführt. Mit diesem Schlauch wurde eine 60 ml Spritze verbunden, über die der nötige Perfusionsdruck erzeugt wurde. Die Kontrolle eines möglichst konstanten Druckes erfolgte über ein ebenfalls angeschlossenes Blutdruckmessgerät. Unter Anästhesie mit 600-900 µl Narcoren wurde der Thorax der Maus eröffnet und mit der Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens gestochen. Die Aorta abdominalis wurde durchtrennt, dann wurde die Maus mit einem möglichst konstanten Druck von 60 mm Hg mit der in Schritt 3 hergestellten Lösung perfundiert. Im Anschluss wurden die beiden Nieren entnommen.

C) Glomerulipräparation

Lösungen:

1 mg/ml HBSS	1 Glas der fertigen Salzmischung (9,8 g, bezogen von der Firma Sigma) in 1 l H ₂ O lösen; Zusammensetzung: 0,19 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,10 g/l MgSO ₄ 0,4g/l KCl 0,06 g/l KH ₂ PO ₄ 8,0 g/l NaCl 0,05 g/l Na ₂ HPO ₄ 1,0 g/l D-Glukose
Kollagenase A	1:14 mit HBSS verdünnen
1x PBS	s. 2.2.2.A

Die entnommenen Nieren wurden gewogen, dann wurden die Kapsel und ein Teil des Hilus entfernt. Mit einer Skalpellklinge wurden die Nieren auf einer mit Alkohol gereinigten Glasplatte möglichst klein geschnitten. Sodann wurde jede Niere getrennt in 1 ml der Kollagenase A-Verdünnung für 30 min bei 37°C in einem 2 ml Reaktionsgefäß verdaut. Dabei wurden die Reaktionsgefäße alle 5 min leicht geschwenkt. Nach Ablauf der 30 min wurden beide Nieren durch einen 100 µm Cell strainer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gedrückt (dazu wurde der Stempel einer 5 ml Spritze verwendet) und 7 ml 1x PBS (auf Eis) hinzugegeben. Der Inhalt des 50 ml Zentrifugenröhrchens wurde in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das 50 ml Zentrifugenröhrchen noch zwei Mal mit je 1,5 ml 1x PBS nachgespült. Das 12 ml Zentrifugenröhrchen wurde für 7 min am Magneten platziert und anschließend die Waschlösung vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt.

Die abgesaugte Waschlösung wurde nach jedem Schritt in eine frische Petrischale gegeben und unter dem Stereomikroskop auf den Gehalt an Nierentubuli beurteilt. Es folgte eine erneute Zugabe von 10 ml 1x PBS, das Zentrifugenröhrchen wurde leicht gerollt und für weitere 5 min am Magneten platziert. Wieder wurde die Waschlösung entfernt und diesmal durch 6 ml 1x PBS ersetzt. Nach leichtem Rollen wurden die 6 ml durch einen neuen 100 µm Cell strainer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gesiebt und mit 2 ml 1x PBS nachgespült. Der Inhalt wurde wieder in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und das 50 ml Zentrifugenröhrchen zwei Mal mit je 1 ml 1x PBS nachgespült. Nach weiteren 5 min am Magneten wurde die Waschlösung wieder durch 10 ml frisches 1x PBS ersetzt. Dieser Schritt wurde nun so lange wiederholt, bis in der Waschlösung unter dem Stereomikroskop keine Tubuli, sondern nur noch Glomeruli zu sehen waren. Nach dem letzten Waschgang erfolgte die Zugabe von 11 ml 1x PBS, der Inhalt wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min abzentrifugiert. Die Flüssigkeit über dem Pellet konnte dann abgesaugt werden. Zu dem Pellet wurden 350 µl Puffer RA1 (NucleoSpin® RNA II-Kit, Firma Macherey-Nagel) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt, das Pellet darin gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde noch mit 50 µl Puffer RA1 und 0,5 µl β-Mercaptoethanol nachgespült (Endvolumen 400 µl). Das Lysat wurde 5 Mal durch eine 21 G x 1 ½ " Kanüle aspiriert, um die DNA zu scheren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

D) RNA-Isolation aus Glomeruli

Zur Isolation von RNA aus Glomeruli (s. 2.2.3.C) wurde der NucleoSpin® RNA II-Kit (Firma Macherey-Nagel) verwendet. Das Vorgehen folgte der Bedienungsanleitung der Herstellerfirma. Am Ende wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C weggefroren.

E) Analyse der Genexpression

Die Analyse der in den glomerulären Zellen synthetisierten RNA erfolgte durch das Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik (Biopark Regensburg) mittels des Genchips

Affymetrix „Mouse Genome 430 2.0“ und wurde uns in Form einer Excel-Tabelle zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Untersuchung verschiedener Nierenschädigungsmodelle an Mäusen

A) Präimmunisierung und Injektion von Anti-GBM-Serum

Lösungen:

Puffer zur Verdünnung von IgG	0,01 M Natriumphosphatpuffer 0,25 M NaCl, pH auf 7,6 einstellen
Kaninchen IgG (11,0 mg/ml)	mit dem Puffer auf 2 mg/ml verdünnt
Komplettes Freund's Adjuvans	Firma Sigma Aldrich; 1 ml enthält: 1 mg Mycobacterium tuberculosis (durch Erhitzen abgetötet und getrocknet) 0,85 ml Mineralöl 0,15 ml Mannitmonooleat
Ketamin 10% / Xylazin 2%	mischen im Verhältnis 2:1
Anti-GBM-Serum	Serum von Kaninchen, die mit Mäuseglomeruli immunisiert wurden (hergestellt von Jürgen Kastner)

Präimmunisierung:

Von dem auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnten Kaninchen IgG wurden je Maus 100 µl entnommen und über ein Drei-Wege-Hahn-System mit je 100 µl kompletten Freund's Adjuvans vermischt, bis eine stabile milchig-weiße Emulsion entstanden war. Von dieser Emulsion wurden den zu immunisierenden Tieren 200 µl subkutan am Bauch injiziert, wobei links und rechts ein Depot mit jeweils etwa 100 µl angelegt wurde.

Injektion von Anti-GBM-Serum:

Am 6. Tag nach der Präimmunisierung wurden die Mäuse zunächst mit ca. 20 µl Ketamin/Xylazin anästhesiert. Den betäubten Mäusen wurden 250 µl des Anti-GBM-Serums hinter das Auge, möglichst intravasal, gespritzt. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Mäuse jeden zweiten Tag für 24 Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt und ihr 24 h-Urin gesammelt. Dessen Proteingehalt wurde anschließend bestimmt (s. 2.2.5.A und B). Am 10. Tag erfolgte die Perfusion mit Entnahme der Nieren und weiterer Präparation der Nierenhälften (s. 2.2.2).

B) Injektion von Lipopolysaccharid

Lösungen:

LPS (aus E. coli)	Firma Sigma (Katalognr. L-2630) mit PBS auf 1 µg/µl verdünnt
1x PBS	s. 2.2.2.A

Den Mäusen wurden 200 µg LPS in einem Volumen von 200 µl intraperitoneal injiziert. Die Auswirkung auf die Nierenfunktion sollte direkt im Anschluss beobachtet werden, deshalb wurden die Mäuse sofort in Stoffwechselkäfige gesetzt und der Proteingehalt des Urins nach 6 Stunden sowie nach einem Tag bestimmt.

C) Implantation eines DOCA-Pellets und einer Angiotensin II-Pumpe nach Uninephrektomie

Lösungen/Materialien:

DOCA-Pellet 50 mg	Firma Innovative Research of America
Menschliches Angiotensin II	Pulver, in der gewünschten Konzentration (siehe Text) in 1x PBS lösen
1x PBS	s. 2.2.2.A

Der Versuchsablauf folgte der Beschreibung von F. Kirchhoff et al., 2008, die in ihrem Artikel die Entwicklung schwerer Endorganschäden nach Uninephrektomie und Einwirkung von Deoxycorticosteronacetat (DOCA) und Angiotensin II beschreiben.

Den Mäusen wurde unter Narkose mit Isofluran zunächst die rechte Niere entnommen. Zwei Wochen später wurde das Pellet mit 50 mg DOCA subkutan an einer Flanke implantiert. Sieben Tage darauf wurde an der gegenüberliegenden Flanke eine Minipumpe mit einer Flüssigkeitsfreisetzung von 0,25 µl/h über 14 Tage eingesetzt (s. Abb. 5). Die Konzentration des eingefüllten Angiotensin II war so gewählt, dass dies einer Infusion von 1,5 ng Angiotensin II pro Minute und Gramm Körpergewicht entsprach. Am 21. Tag wurden die Mäuse perfundiert, ihre Nieren entnommen und weiterverarbeitet (s. 2.2.2).

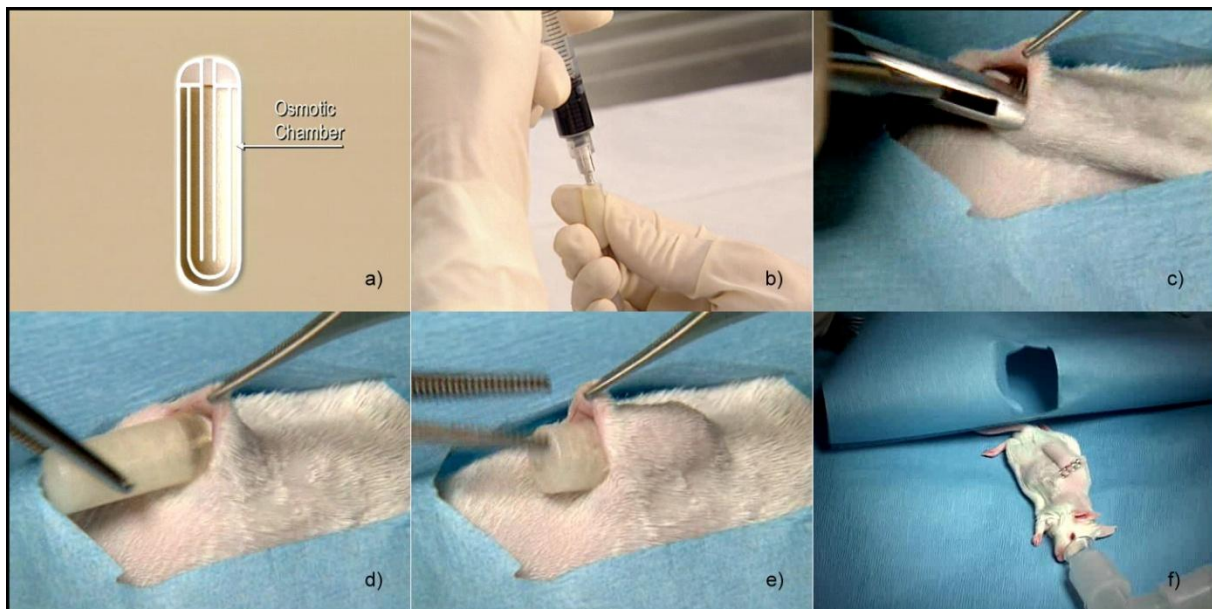


Abb.5. Implantation einer mikroosmotischen Pumpe: a) Querschnitt einer mikroosmotische Pumpe; b) Befüllen der Pumpe; c)-f) Subkutane Implantation (Bilder entstammen dem Demonstrationsvideo der Firma Alzet).

D) Erstellen von Überlebenskurven bei *Rb-lox3(926)* / *Lmx1b*^{2loxP} / P2.5-Cre-Mäusen

Materialien:

Tätowierfarbe grün

Firma Hauptner und Heberholz;

zur besseren Dosierung in Spritze aufziehen

Erkennbar trächtige Mäuse wurden isoliert, um die Nachkommen eindeutig zuordnen zu können. Den neugeborenen Mäusen wurde zwischen dem 3. und 5. Lebenstag ein Stück Schwanz abgeschnitten und zur Zuordnung die Pfoten nach einem bestimmten Muster mit grüner Farbe tätowiert. Diese Tiere wurden über insgesamt acht Wochen beobachtet, um festzustellen, wann eines verstarb. Die Verarbeitung der Schwanzproben und die Genotypisierung erfolgten wie unter 2.2.1.A-C beschrieben. Das Überleben wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven ausgewertet.

2.2.5 Arbeit mit Proteinen

A) Aufbereitung von Mäuseurin

Der durch 24-stündige Haltung in Stoffwechselkäfigen gewonnene Mäuseurin wurde für 15 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Dabei wurde auch jeweils das Volumen bestimmt. Die weitere Lagerung bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration fand bei -80°C statt.

B) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Lösungen:

BSA-Eichlösungen (in H ₂ O)	BSA in den Konzentrationen 0,2 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml, 2,4 mg/ml, 4,8 mg/ml (es wurden jeweils 5 µl der Eichlösung eingesetzt)
Roti®Quant	Firma Roth; 1:5 mit H ₂ O verdünnen

Für die Proteinbestimmungen wurden immer Plastikküvetten verwendet. Zunächst wurde eine Eichkurve erstellt. Dazu waren sieben Küvetten unterschiedlichen Inhalts erforderlich:

- 1) Küvette mit 1 ml H₂O (= Nullabgleich)
- 2) Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung (= Leerwert)

- 3) Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung + 5 µl BSA-Eichlösung
(c = 0,2 mg/ml)
- 4) Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung + 5 µl BSA-Eichlösung
(c = 0,6 mg/ml)
- 5) Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung + 5 µl BSA-Eichlösung
(c = 1,2 mg/ml)
- 6) Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung + 5 µl BSA-Eichlösung
(c = 2,4 mg/ml)
- 7) Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung + 5 µl BSA-Eichlösung
(c = 4,8 mg/ml)

Zunächst wurde das Photometer bei 590 nm mit der Küvette mit 1 ml H₂O auf Null eingestellt. Dann wurde die Absorption der anderen sechs Küvetten gemessen. Genauso wurde anschließend bei der Wellenlänge 450 nm vorgegangen. Aus den so erhaltenen Werten wurde in mehreren Rechenschritten die mittlere Steigung der Absorptionskurve errechnet:

- 1) $a = A_{590}/A_{450}$ für jedes Wertepaar berechnen
- 2) $b = a \cdot A_{590(\text{Leerwert})}/A_{450(\text{Leerwert})}$ für jeden Wert berechnen
- 3) die jeweiligen Steigungen ergeben sich folgendermaßen:
1 µg/b₁; 3 µg/b₂; 6 µg/b₃; 12 µg/b₄; 24 µg/b₅ (b₁ bis b₅ bezeichnet den jeweils für diese Probe unter 2) berechneten Wert)
- 4) aus den in 3) erhaltenen Werten den Mittelwert bilden; weicht ein Wert sehr stark ab, so wird er bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt.

Um nun den Proteingehalt der Urinproben zu bestimmen, wurden von jeder Probe 1-2 µl in eine Küvette mit 1 ml verdünnter Roti®Quant-Lösung gegeben, gut durchgemischt und wie oben bei 590 nm und 450 nm vermessen (Anmerkung: Die Messung der Absorptionen für die Eichkurve und die Proben erfolgte in einem Arbeitsgang, sie ist hier nur der Übersichtlichkeit wegen aufgegliedert). Aus diesen Wertepaaren wurde die Proteinkonzentration folgendermaßen berechnet:

- 1) $a = A_{590}/A_{450}$ für jedes Wertepaar berechnen
- 2) $b = a \cdot A_{590(\text{Leerwert})}/A_{450(\text{Leerwert})}$ für jeden Wert berechnen
- 3) $b \times \text{Mittelwert (s. oben)}$ für jeden Wert aus 2)

- 4) Zur Bestimmung der Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde der Wert aus 3) noch durch die eingesetzte Menge (meist 1 μl oder 2 μl) dividiert.

C) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Firma Serva; 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid
TEMED	Firma Serva; N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
APS	10% APS in H ₂ O
10x Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1% SDS
5x SDS-Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,7 50% Glycerin 12,5% SDS 12,5% β -Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau
Molekulargewichtsstandard	175 kDa (MBP- β -Galaktosidase), 83 kDa (MBP-Paramyosin), 62 kDa (Glutamat-Dehydrogenase), 47,5 kDa (Aldolase), 32,5 kDa (Triosephosphat-Isomerase), 25 kDa (β -Lactoglobulin A), 16,5 kDa (Lysozym), 6,5 kDa (Aprotinin)

Es wurden 10%ige Gele verwendet:

Trenngel (28 ml):	30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	9,3 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	7,0 ml
	H ₂ O	11,6 ml
	TEMED	16,0 µl
	10% APS	78,0 µl
Sammelgel (10 ml):	30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	1,3 ml
	0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
	H ₂ O	6,1 ml
	TEMED	10,0 µl
	10% APS	50,0 µl

Zwischen die beiden Glasplatten des Gelsystems wurde das gut durchmischte, noch flüssige Trenngel pipettiert und zur Herstellung einer horizontalen Grenzfläche mit 50% Ethanol überschichtet. Nach etwa einer Stunde wurde der Ethanol abgegossen und mit H₂O nachgespült. Nun wurde darauf das Sammelgel gegossen, ein Probenkamm eingesteckt und das Gel so bis zur Aushärtung belassen. Die Urinproben wurden folgendermaßen vorbereitet:

2 µl Probe + 5 µl 5x SDS-Probenpuffer + 18 µl Aqua bidest -> gut mischen

Als Standard wurden neben dem Molekulargewichtsstandard noch 1 µg, 3 µg, 10 µg und 30 µg BSA verwendet, um die Albuminmenge in den Urinproben in etwa abschätzen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei 500 V unter Kühlung, als Laufpuffer diente der 1:10 verdünnte 10x Laufpuffer.

D) Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Lösungen:

Färbelösung	0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250
	50% Methanol
	10% Essigsäure
Entfärbelösung	50% Methanol
	10% Essigsäure

Das in der Gelelektrophorese (s. 2.2.5.C) gewonnene Gel wurde etwa 40 min in der Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Die Färbelösung wurde sodann durch Entfärbelösung ersetzt und diese mehrmals gewechselt, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war. Zur Dokumentation wurde das gefärbte Gel in eine Klarsichtfolie gelegt und eingescannt.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion von Nierenversagen durch Injektion von Anti-GBM-Serum

3.1.1 Entwicklung von Nierenversagen bei BL/6-Mäusen der Linie *Lmx1b* ko

Da heterozygote *Lmx1b* Knock-out Mäuse in bisherigen Untersuchungen keinen auffälligen Phänotyp zeigten (Rohr C et al., 2002), wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene nierenschädigende Versuchsansätze erprobt, um eventuell doch einen Unterschied zwischen heterozygoten Tieren und solchen mit zwei Wildtypallelen zu beobachten. Ein Ansatz war die Nierenschädigung mittels Injektion von gegen die glomeruläre Basalmembran gerichteten Antikörpern. Dazu wurden insgesamt 13 weibliche Mäuse vom Genotyp *Lmx1b*^{+/-} und 14 vom Genotyp *Lmx1b*^{+/+} entsprechend dem unter 2.2.4.A beschriebenen Verfahren mit Kaninchen IgG und sechs Tage danach mit Anti-GBM-Serum behandelt und dann die Entwicklung einer Proteinurie durch Sammeln des 24 h-Urins jeden zweiten Tag beobachtet. Um sicher zu gehen, dass der im Urin gemessene Proteingehalt nicht durch Verunreinigungen zustande gekommen war, sondern wirklich der Niere entstammte, wurde gemäß dem Protokoll unter 2.2.5.C und D eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 5).

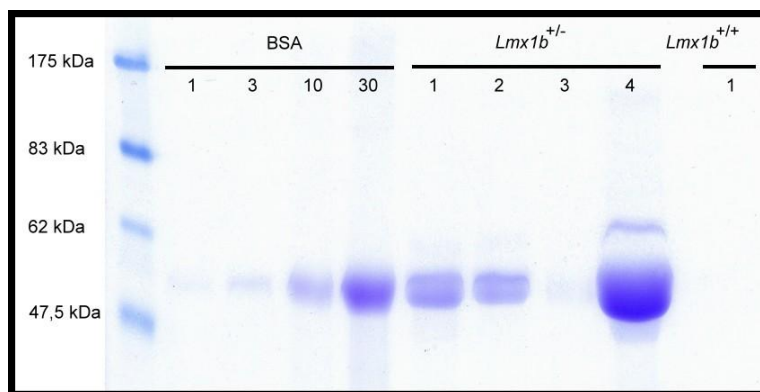


Abb. 5: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Urinproben. Die Proteinbande der Urinproben bei den *Lmx1b*^{+/-} Mäusen entspricht eindeutig der des zur Kontrolle aufgetragenen Albumins (1, 3, 10 und 30 µg BSA). Somit kann man davon ausgehen, dass die Proteine wirklich den Glomeruli entstammten. Eine semiquantitative Abschätzung der Proteinmenge ist durch Vergleich mit den vier Kontrollbanden möglich. Bei der mit aufgetragenen Probe der *Lmx1b*^{+/+} Maus zeigt sich keine Bande, entsprechend der fehlenden Proteinurieentwicklung. Die anderen Proben der *Lmx1b*^{+/+} Mäuse wurden auf dem Bild abgeschnitten, sie zeigten aber alle keine Banden.

Im Verlauf des 10-tägigen Beobachtungszeitraums konnte man feststellen, dass die Mäuse vom Genotyp *Lmx1b*^{+/+} nie eine Proteinurie entwickelten. Das Verhalten der *Lmx1b*^{+/-} Mäuse hingegen variierte ganz erheblich von vollständig fehlender bis hin zu sehr starker Proteinurieentwicklung, was sich in den hohen Standardabweichungen dieser Gruppe niederschlägt (s. Abb. 6).

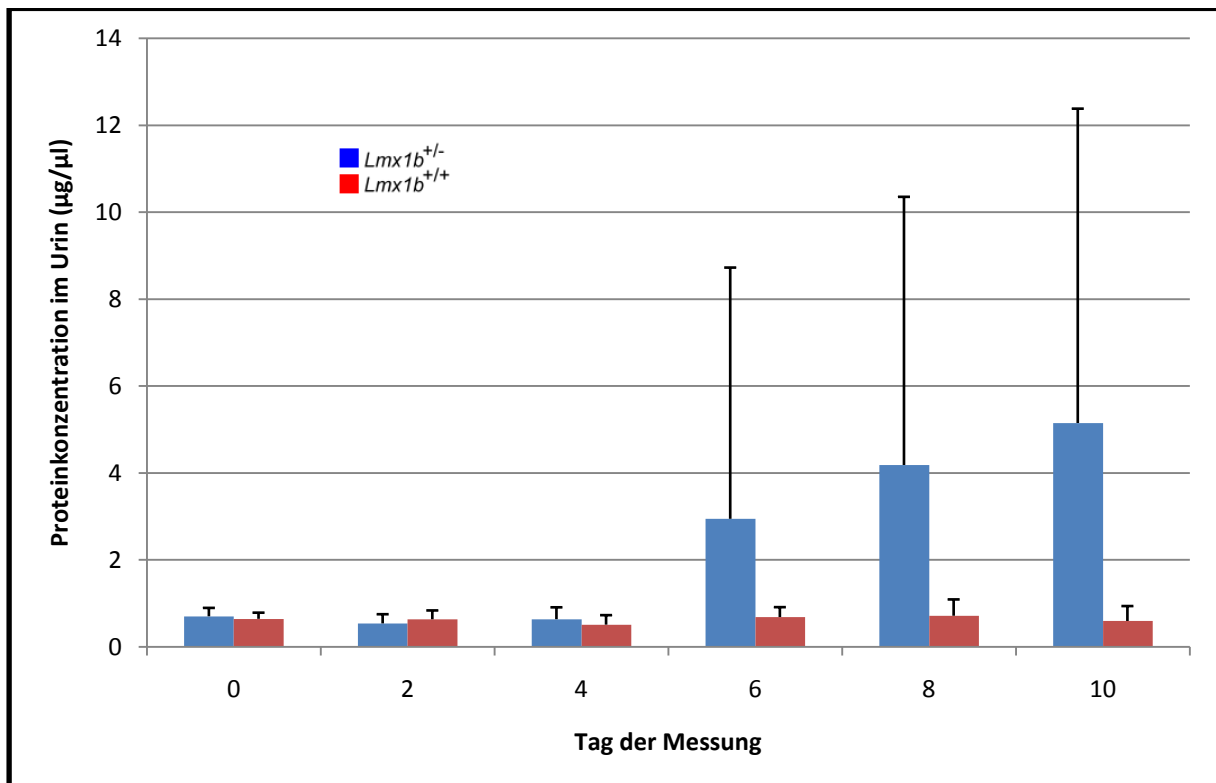


Abb. 6: Grafische Darstellung der Proteinkonzentrationen im Urin im zeitlichen Verlauf (Mittelwerte + Standardabweichung). Während bei den *Lmx1b*^{+/+} Mäusen (n = 14) der Proteingehalt im Urin über 10 Tage konstant niedrig war, zeigten die *Lmx1b*^{+/-} Mäuse (n = 13) ein stark unterschiedliches Verhalten mit teils starker Proteinurieentwicklung.

Wendet man für die Werte der einzelnen Mäuse an Tag 10 den Student's t-Test an, so ergibt sich trotz der großen Varianz ein $p = 0,061$. Dieses Ergebnis mag zwar nicht signifikant sein, weist aber doch deutlich darauf hin, dass in den Reaktionen der beiden Mausgenotypen auf die Injektion von Anti-GBM-Serum ein echter Unterschied bestehen könnte und ein signifikantes Ergebnis eventuell mit einer größeren Fallzahl erreichbar wäre.

Zur Beurteilung der Reaktionen in den Nieren wurden die Mäuse außerdem an Tag 10 perfusionsfixiert und ihre Nieren für Licht- und Elektronenmikroskopie präpariert (s. 2.2.2). Bereits im lichtmikroskopischen Bild erkennt man vor allem bei den *Lmx1b*^{+/-} Mäusen schwer geschädigte Glomeruli und mit Proteinzyclindern ausgefüllte Tubuli (s. Abb. 7 und 8).

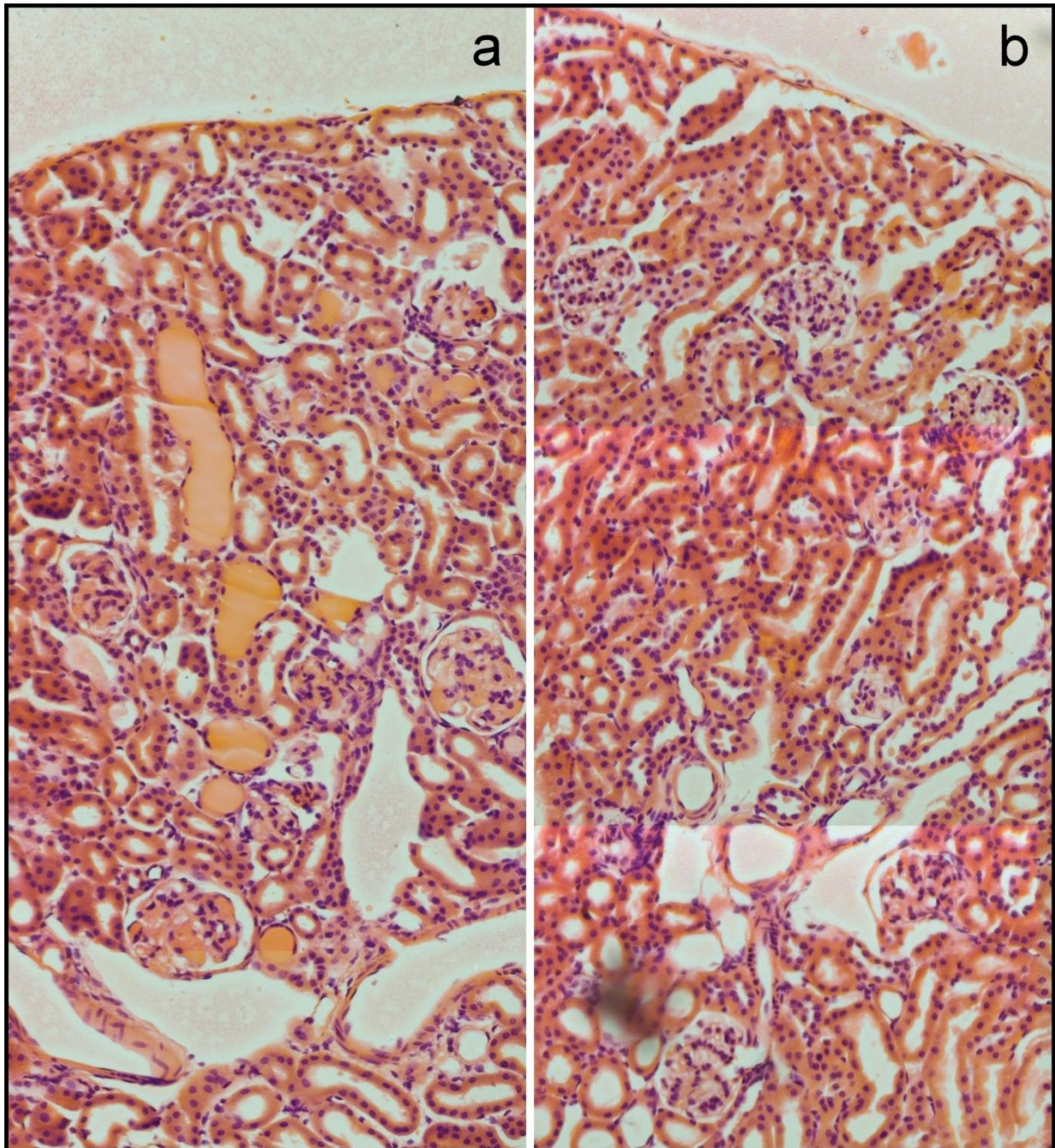


Abb. 7: HE-Färbung zweier Nieren im Vergleich (Vergrößerung 20x). a) *Lmx1b*^{+/-}; man erkennt zahlreiche mit Proteinzyclindern ausgefüllte Tubuli sowie stark veränderte Glomeruli. b) *Lmx1b*^{+/+}; normaler Nierenbefund.

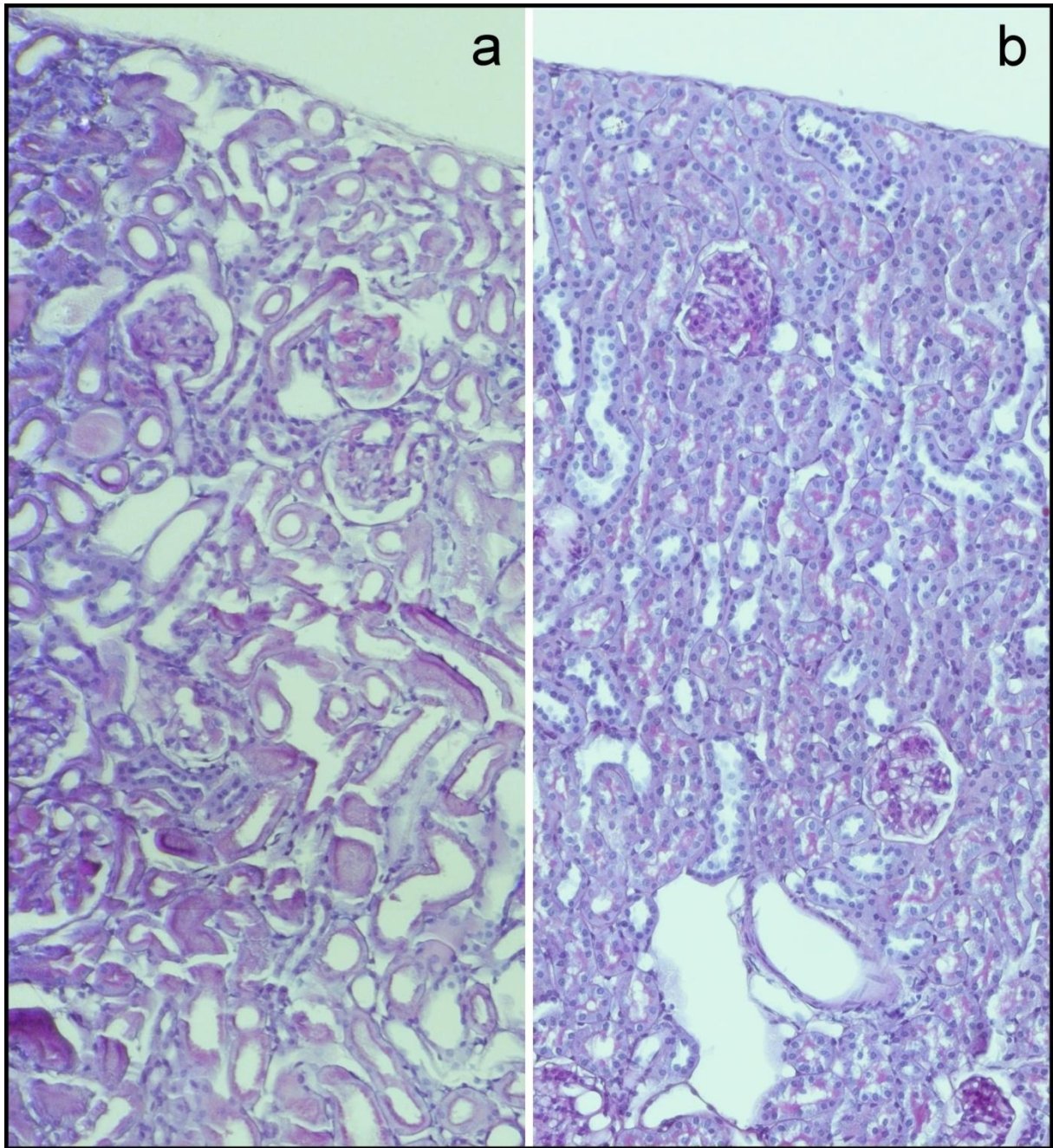


Abb. 8: PAS-Färbung zweier Nieren im Vergleich (Vergrößerung 20x). a) *Lmx1b*^{+/-}; man sieht besser als in der HE-Färbung die veränderte Struktur der Glomeruli. b) *Lmx1b*^{+/+}; hier sind nur die Bürstensäume der Tubuli erkennbar rosa gefärbt, es sind keine Proteinzylinder oder abnorme Glomeruli erkennbar.

Elektronenmikroskopisch ist das Bild noch eindrucksvoller: Bei der *Lmx1b*^{+/-} Maus sind nur noch verplumpte Podozytenfortsätze zu erkennen, die glomeruläre Basalmembran ist stark verdickt und man sieht Proteinpräzipitate im Raum unter der Bowmanschen Kapsel, der zudem noch deutlich verbreitert ist. Demgegenüber zeigt die *Lmx1b*^{+/+} Maus einen völlig unauffälligen Befund (s. Abb. 9 und 10).

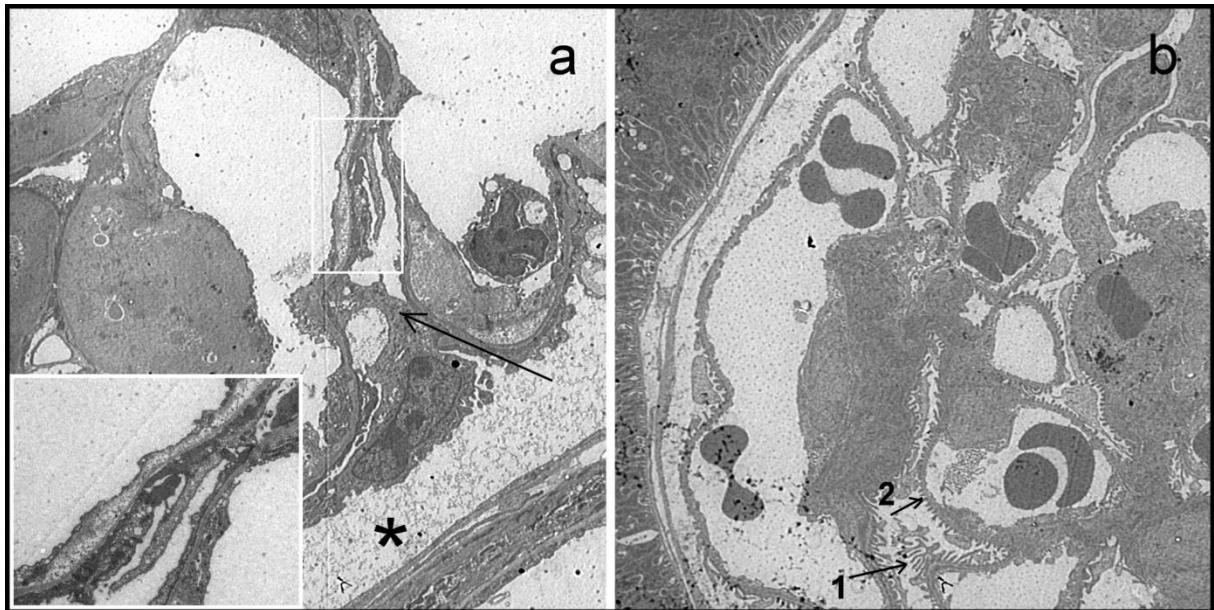


Abb. 9: Elektronenmikroskopisches Bild zweier Glomeruli. a) *Lmx1b*^{+/-}; die normalerweise feinen Podozytenfortsätze sind kaum mehr zu erkennen (Pfeil), die GBM ist stark verdickt (Ausschnitt), im Raum unter der Bowmanschen Kapsel sieht man zahlreiche Proteinpräzipitate (*) (Vergrößerung 1.100x). b) *Lmx1b*^{+/+}; Normalbefund mit feinen Podozytenfortsätzen (Pfeil 1) und schmäler GBM (Pfeil 2) (Vergrößerung 1.100x).

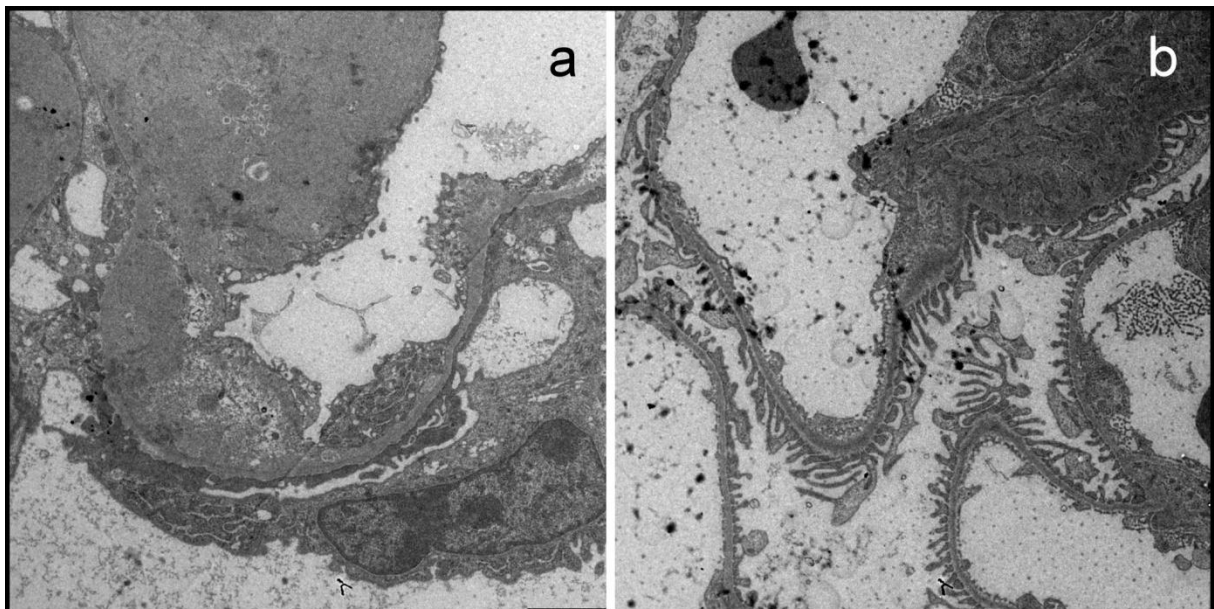


Abb. 10: Elektronenmikroskopisches Bild zweier Glomeruli. a) *Lmx1b*^{+/-}; in der höheren Vergrößerung ist die zerstörte Podozytenstruktur noch deutlicher zu erkennen (Vergrößerung 3.000x). b) *Lmx1b*^{+/+}; Normalbefund mit feinen Podozytenfortsätzen (Vergrößerung 3.000x).

Insgesamt ergab sich der Eindruck einer deutlich stärker ausgeprägten Reaktion der *Lmx1b*^{+/-} Mäuse im Vergleich zu jenen mit zwei Wildtypallelen, der vielleicht noch mit größeren Fallzahlen zu untersuchen wäre.

3.1.2 Entwicklung von Nierenversagen bei JF1-Mäusen der Linie *Lmx1b* ko

Zur Aufklärung stammspezifischer Unterschiede wurde der Versuch mit konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen auf JF1-Hintergrund wiederholt. Der Versuchsablauf entsprach also dem unter 3.1.1 beschriebenen. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die Uringewinnung aufgrund der geringen Größe der Mäuse oft schwer und teilweise gar nicht möglich war, sodass die Ergebnisse unter Umständen stärker mit Fehlern behaftet sind als die unter 3.1.1. Beim ersten Versuch wurden vier Mäuse vom Genotyp *Lmx1b*^{+/-} und vier vom Genotyp *Lmx1b*^{+/+} verwendet. Sämtliche Mäuse beider Genotypen entwickelten eine starke Proteinurie, in deren Verlauf kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen erkennbar war (s. Abb. 11).

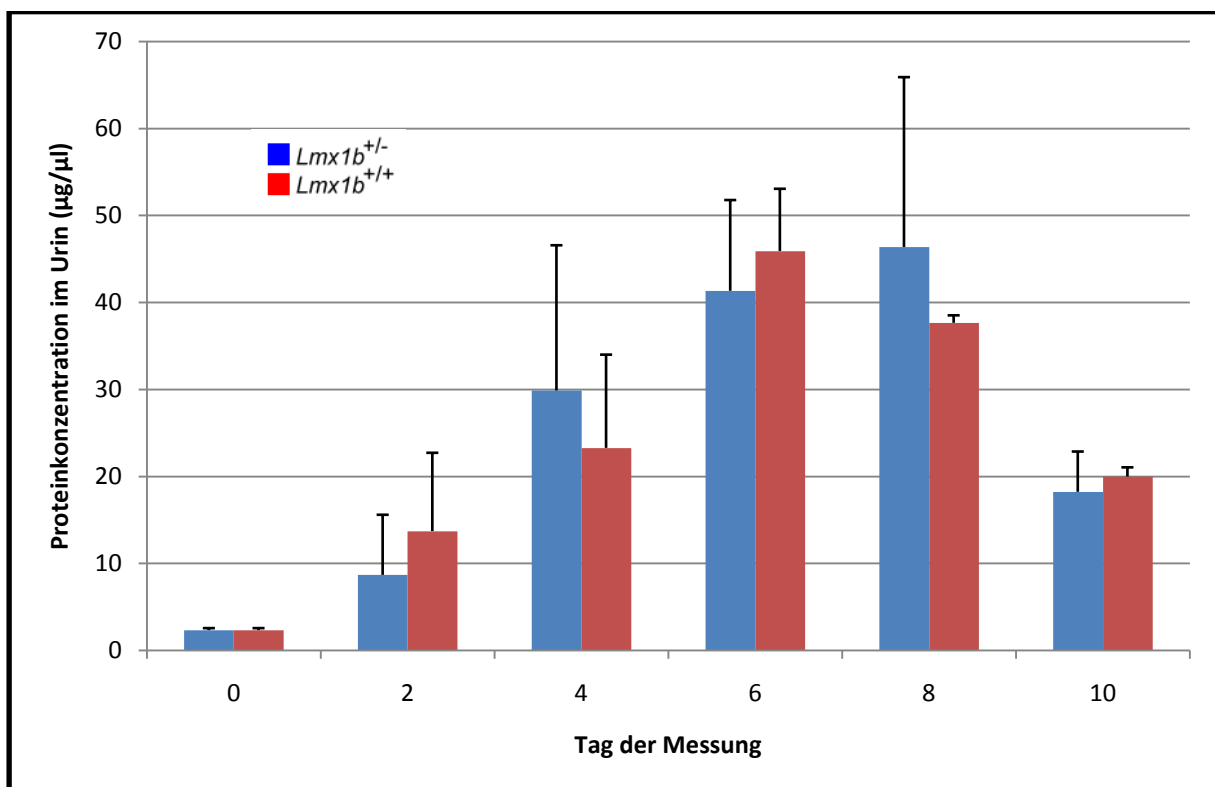


Abb. 11: Proteinurieentwicklung bei JF1-Mäusen (Mittelwerte + Standardabweichung). Nach Injektion von unverdünntem Anti-GBM-Serum ist im Verlauf kein Unterschied in der Proteinausscheidung der verschiedenen Genotypen zu erkennen (n = 4).

Sowohl in den licht- als auch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich eine schwerwiegende Schädigung der glomerulären Struktur, die aber keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erkennen lässt (s. Abb. 12 und 13).

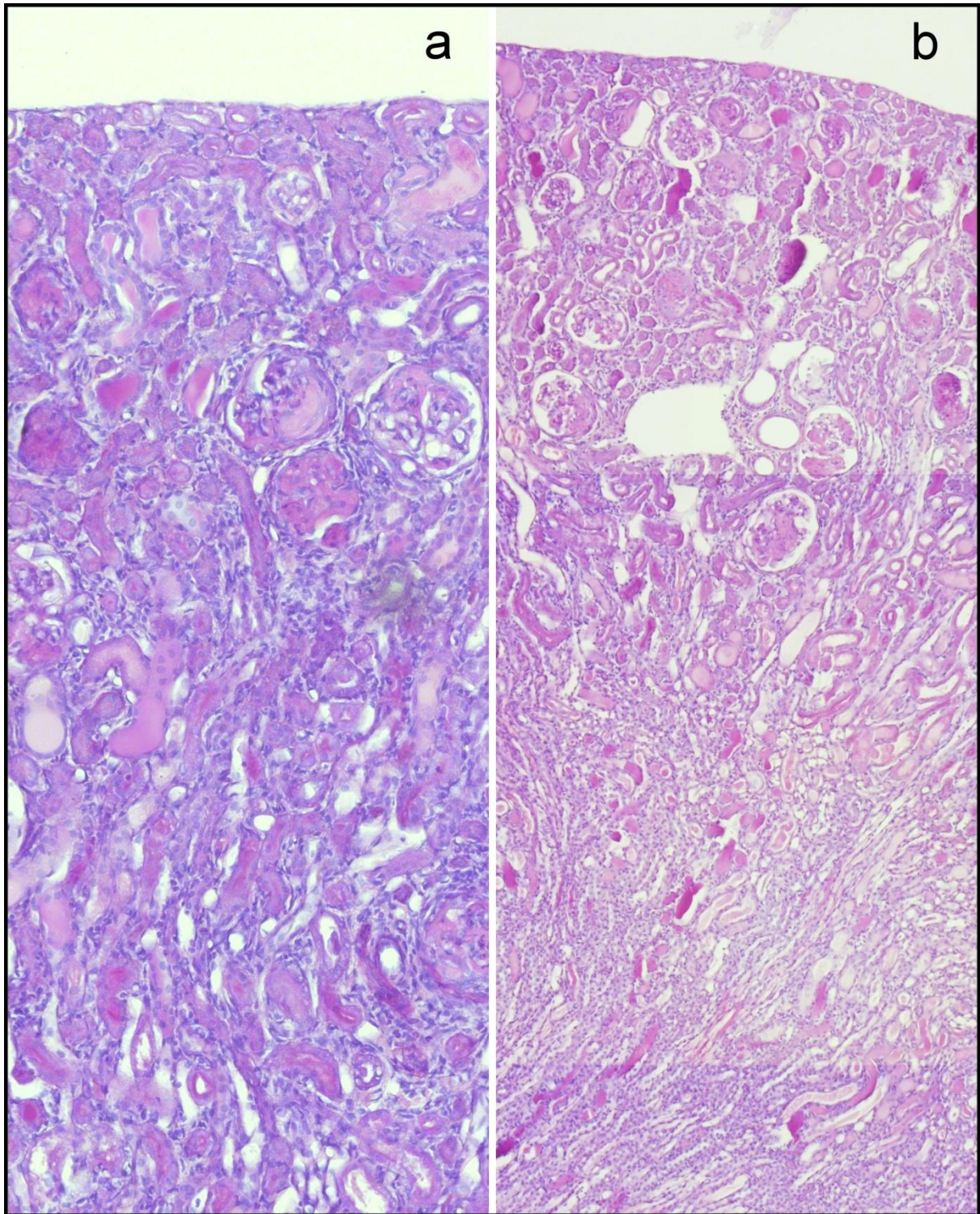


Abb. 12: PAS-Färbung zweier Nieren von JF1-Mäusen nach Injektion von unverdünntem Anti-GBM-Serum (Vergrößerung 20x). a) *Lmx1b*^{+/-}, b) *Lmx1b*^{+/+}. In beiden Bildern sieht man zahlreiche Proteinzylinder in den Tubuli und sklerosierte Glomeruli. Ein Unterschied im Schädigungsmuster oder -ausmaß ist nicht erkennbar.

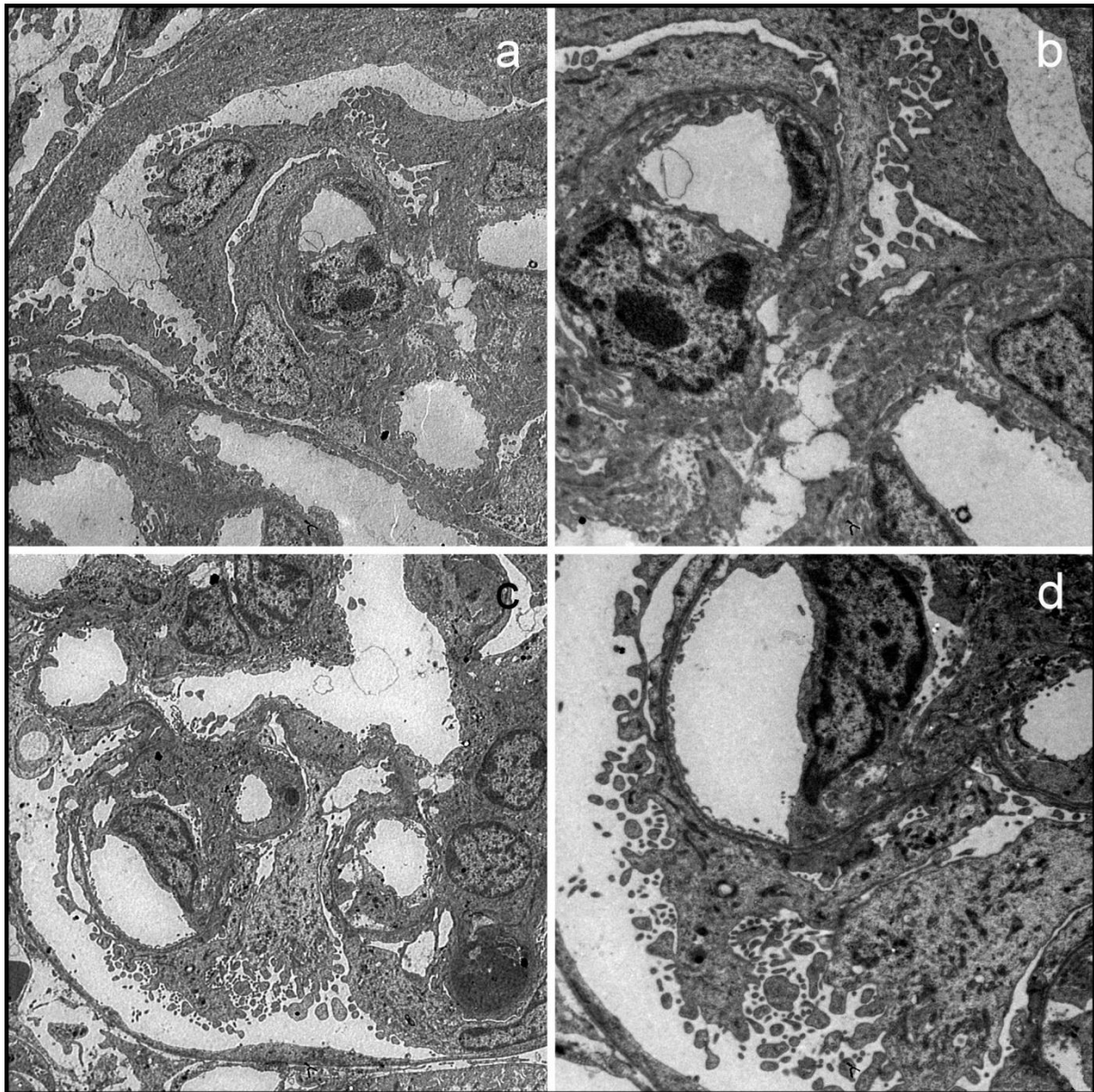


Abb. 13: Elektronenmikroskopisches Bild der Nieren von Abb. 12. a) *Lmx1b*^{+/-} (Vergrößerung 1.100x). b) *Lmx1b*^{+/-} (Vergrößerung 3.000x). c) *Lmx1b*^{+/+} (Vergrößerung 1.100x). d) *Lmx1b*^{+/+} (Vergrößerung 3.000x). Sowohl in den niedrigeren Vergrößerungen von a) und c) als auch den höheren Vergrößerungen von b) und d) imponiert eine schwere glomeruläre Schädigung mit Zerstörung der Podozytenarchitektur. Ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ist nicht auszumachen.

Als mögliche Erklärung für die starken Reaktionen auf die Injektion von unverdünntem Anti-GBM-Serum bei beiden Genotypen kam das deutlich geringere Körpergewicht (durchschnittlich etwa 13 g bei JF1-Mäusen vs. 23 g bei BL/6-Mäusen) gegenüber dem der BL/6-Mäuse und damit die in Relation erheblich größere Menge an injiziertem Serum in Frage. Deshalb wurde der Versuch wiederholt, wobei diesmal von jedem Genotyp jeweils eine Maus das unverdünnte Serum, zwei Mäuse das Serum in einer Verdünnung von 1:3 und

zwei Mäuse das Serum in einer Verdünnung von 1:9 (jeweils mit 0,9% NaCl verdünnt) erhielten. Doch auch hier war in der Proteinausscheidung keine merkliche Differenz erkennbar (s. Abb. 14: hier sind nur die Proteinkonzentrationen der Mäuse dargestellt, die die 1:3 Verdünnung erhalten hatten, bei den anderen zeigte sich aber ein ähnliches Bild, weshalb sie nicht extra dargestellt werden).

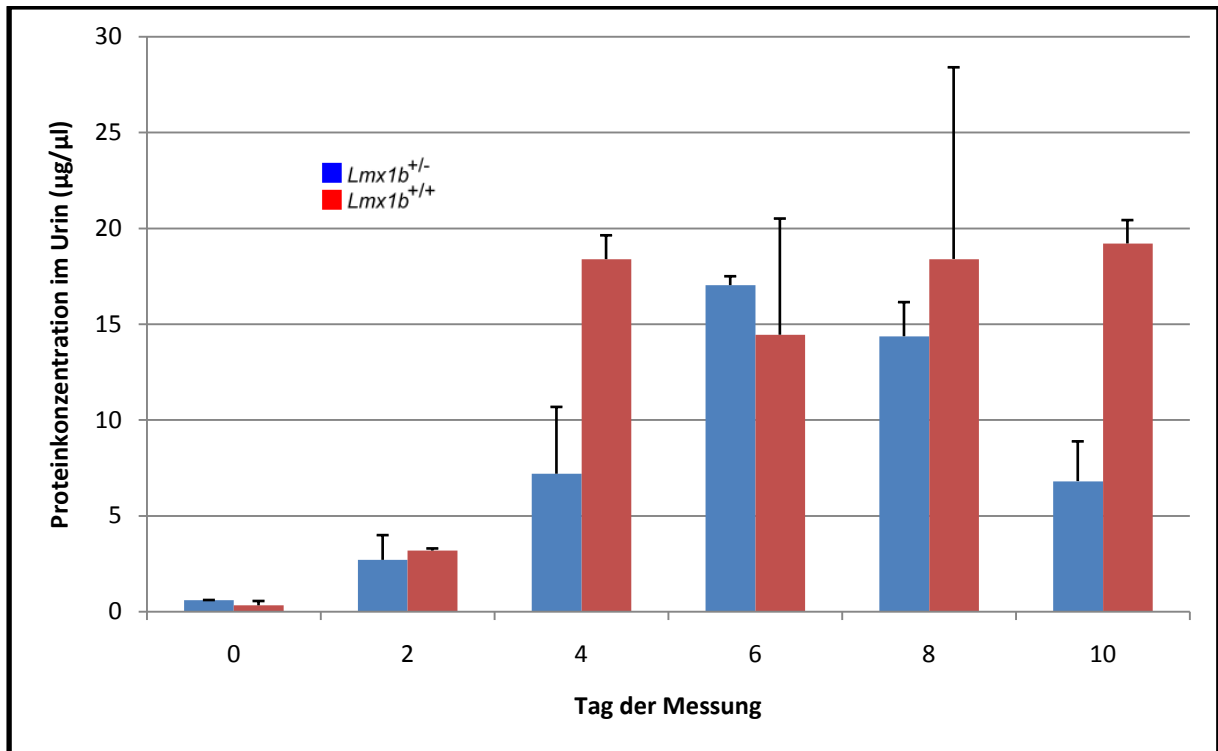


Abb. 14: Entwicklung von Proteinurie bei JF1-Mäusen und Gabe von 1:3 verdünntem Anti-GBM-Serum (Mittelwerte + Standardabweichung). Im Verlauf der 10 Tage ist keine eindeutig unterschiedliche Entwicklung zu sehen. Man könnte den Eindruck gewinnen, dass bei den *Lmx1b*^{+/-} Mäusen die Proteinausscheidung gegen Ende hin wieder nachlässt, doch möglicherweise ist dies nur durch die sehr niedrige Fallzahl verursacht (n = 2).

Trotz der starken Proteinurie musste man in den elektronenmikroskopischen Bildern der mit 1:9 verdünntem Serum behandelten Mäusen feststellen, dass die Glomeruli völlig intakt waren (s. Abb. 15), was die Vermutung bestärkt, dass die Proteinmessungen in diesem Versuch nicht ausreichend aussagekräftig waren.

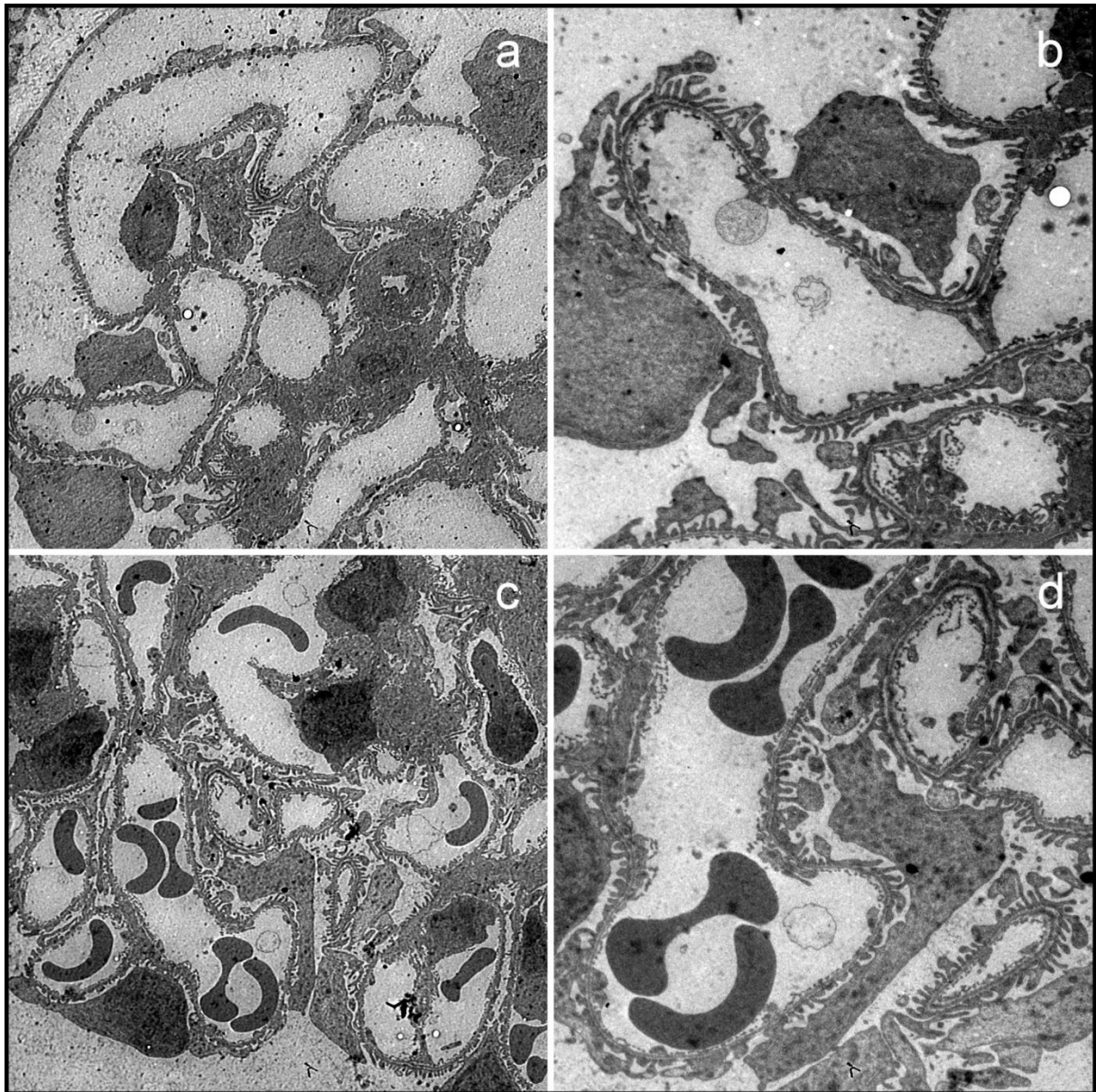


Abb. 15: Glomeruli von JF1-Mäusen nach Behandlung mit 1:9 verdünntem Anti-GBM-Serum. a) *Lmx1b*^{+/-} (Vergrößerung 1.100x). b) *Lmx1b*^{+/-} (Vergrößerung 3.000x). c) *Lmx1b*^{+/-} (Vergrößerung 1.100x). d) *Lmx1b*^{+/-} (Vergrößerung 3.000x). Man sieht vollkommen unauffällige Glomeruli mit normaler glomerulärer Basalmembran und feinen Podozytenfortsätzen trotz deutlich erhöhtem Proteingehalt im Urin.

Bei den Bildern der mit 1:3 verdünntem Serum behandelten Mäusen wiederum ist eine schwerwiegende Schädigung der Glomeruli zu erkennen, wenn auch das Ausmaß der Schädigung nicht an das der mit unverdünntem Serum behandelten Mäuse heranreicht (Abb. 16). Ein Unterschied zwischen den Tieren ist jedoch wiederum nicht zu erkennen. Insgesamt muss man aber festhalten, dass für weitere Versuche in dieser Richtung

vermutlich das Serum in 1:3 Verdünnung am vielversprechendsten ist, um bei größeren Fallzahlen als wie hier nur zwei Mäusen eventuell doch ein unterschiedliches Verhalten zu entdecken.

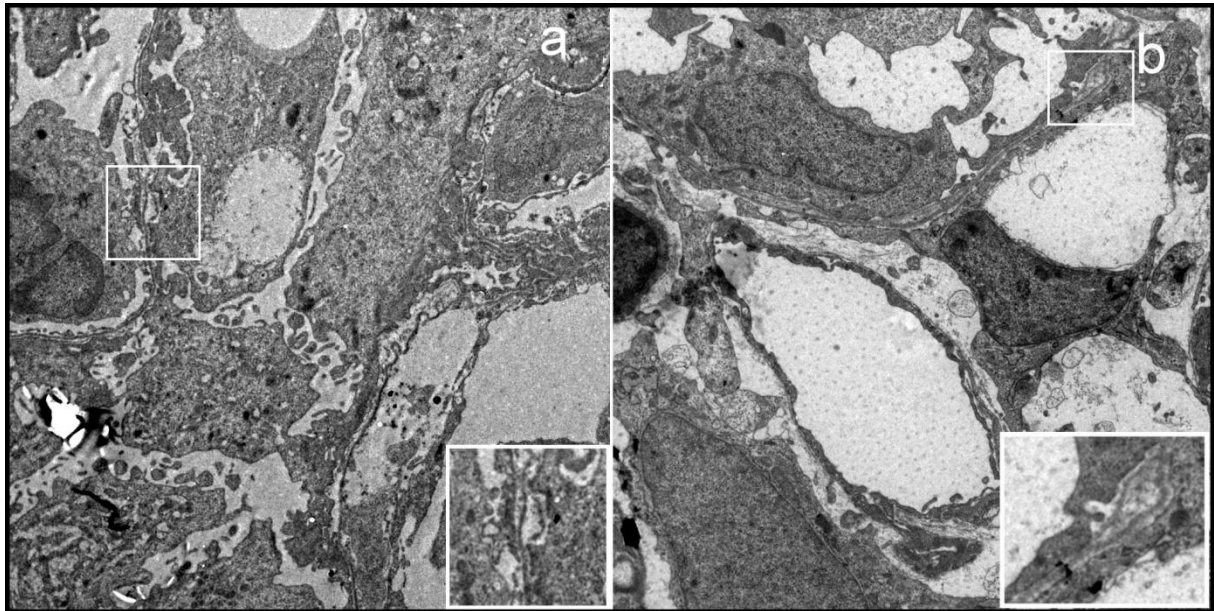


Abb. 16: Glomeruli von JF1-Mäusen nach Behandlung mit Anti-GBM-Serum in 1:3 Verdünnung (Vergrößerung 3.000x): a) $Lmx1b^{+/-}$ b) $Lmx1b^{+/+}$. Beide Glomeruli weisen Schädigungen in Form einer gesplitteten GBM (s. Ausschnitt) und verlorener Podozytenfortsätze auf, ein Unterschied ist jedoch nicht zu erkennen.

3.1.3 Entwicklung von Nierenversagen bei BL/6-Mäusen der Linie $Lmx1b^{2loxP}$ x P2.5-Cre

Auch hier wurde gemäß dem unter 3.1.1 beschriebenen Protokoll vorgegangen. Die Auswahl der Linie $Lmx1b^{2loxP}$ x P2.5-Cre mit der podozytenspezifischen Inaktivierung von $Lmx1b$ für diesen weiteren Versuch erfolgte mit dem Ziel zu überprüfen, ob die unter 3.1.1 beobachtete Reaktion auf Injektion von Anti-GBM-Serum unter diesen Bedingungen ebenfalls eintreten würde und damit, ob die Reaktion der Nieren eher auf die systemische Wirkung von $Lmx1b$ zum Beispiel auf das Immunsystem oder vielmehr auf eine lokale Wirkung im Podozyten zurückgeht. Für den Versuch wurden drei Mäuse vom Genotyp $Lmx1b^{+/lox}$, Cre+ und drei vom Genotyp $Lmx1b^{+/+}$, Cre+ eingesetzt. Im Verlauf der 10 Tage konnte bei keiner der sechs Mäuse ein deutlicher Anstieg des Proteingehalts im Urin beobachtet werden (s. Abb. 17).

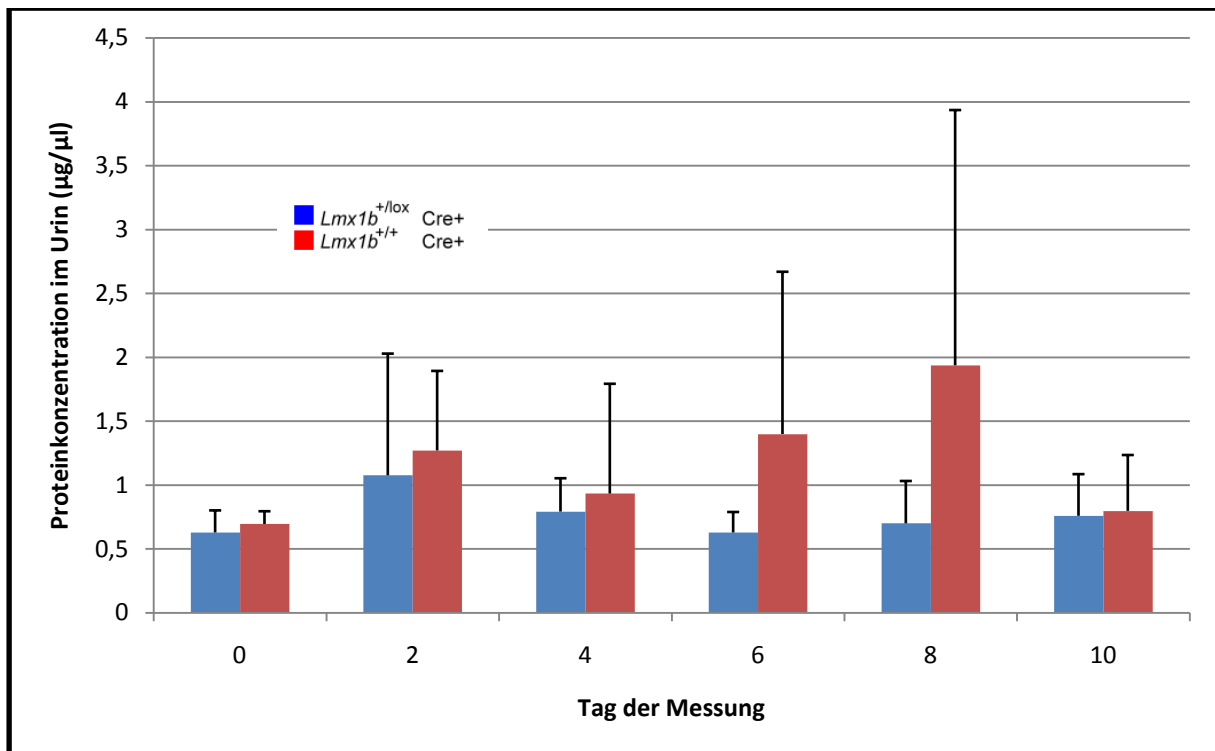


Abb. 17: Proteinkonzentrationen im Urin nach Anti-GBM-Serum-Injektion bei *Lmx1b*^{2loxP} x P2.5-Cre Mäusen (Mittelwerte + Standardabweichung). Insgesamt zeigt keine der beiden Linien eine deutliche Proteinurieentwicklung im Verlauf der zehntägigen Beobachtung (n = 3).

Im lichtmikroskopischen Bild waren dementsprechend auch keine pathologischen Veränderungen zu erkennen. Auf elektronenmikroskopische Bilder wurde verzichtet, da auch hier keine Veränderungen der glomerulären Struktur zu erwarten waren.

3.2 Induktion von Nierenversagen durch Injektion von Lipopolysaccharid

Nachdem Wei C et al. (2008) die Entwicklung einer Proteinurie bei Mäusen nach Injektion von Lipopolysaccharid beschrieben hatten, erschien dieser Versuchsansatz als ein weiteres Verfahren zur Untersuchung der Reaktion von konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen auf Nierenschädigungen geeignet. Für den Versuch wurde vier weiblichen Mäusen vom Genotyp *Lmx1b*^{+/-} und sechs vom Genotyp *Lmx1b*^{+/+} gemäß der Beschreibung unter 2.2.4.B 200 µg LPS injiziert und der Proteingehalt im 6-Stunden und im 24-Stunden-Urin bestimmt. Obwohl ein paar der Tiere an dem durch LPS verursachten septischen Schock starben, kam es dennoch zu keiner merklichen Proteinausscheidung bei einem der beiden Genotypen (s. Abb. 18), so dass auch bei den überlebenden Tieren auf eine Perfusion verzichtet wurde.

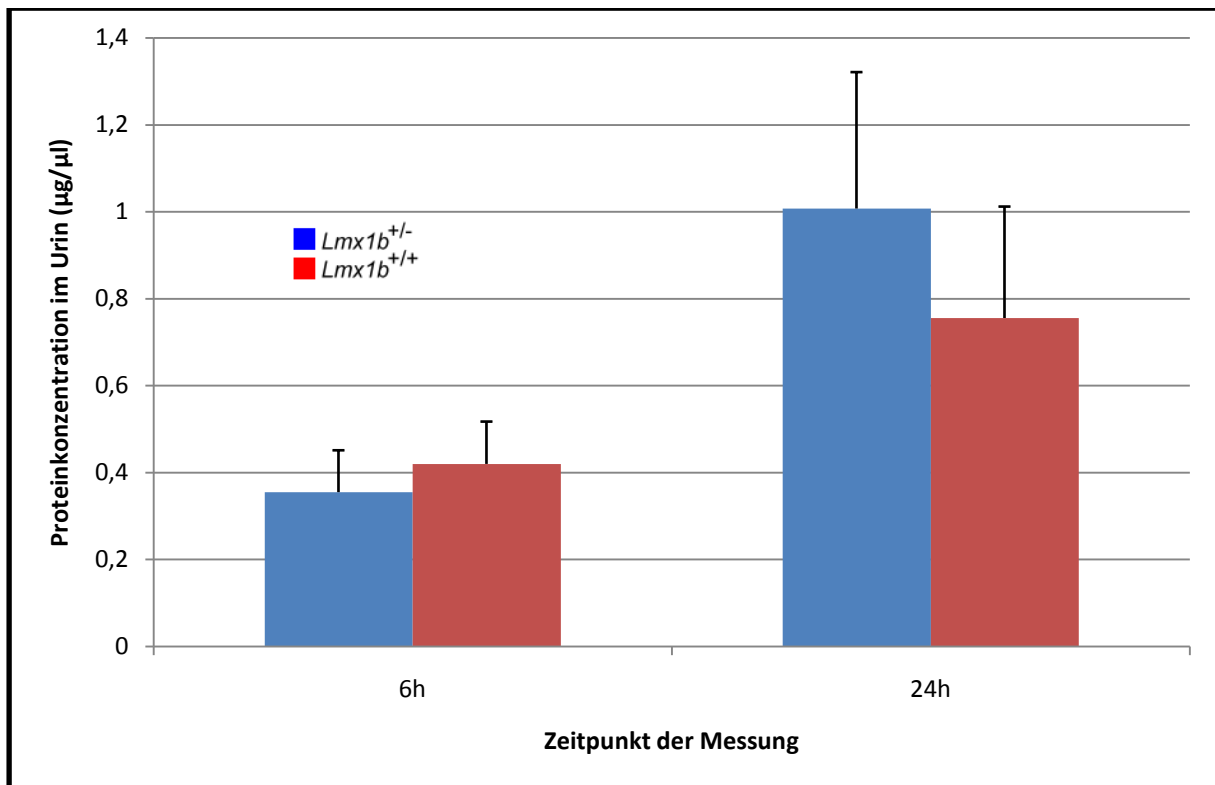


Abb. 18: Proteinkonzentration im Urin nach Injektion von LPS (Mittelwerte + Standardabweichung). Keiner der beiden Genotypen zeigt eine merkliche Proteinurie als Reaktion auf die Injektion von LPS (n = 4 für *Lmx1b*^{+/-} und n = 6 für *Lmx1b*^{+/+}).

3.3 Ausbildung eines Nierenschadens nach Implantation eines DOCA-Pellets und einer Angiotensin II-Pumpe bei uninephrektomierten Mäusen

Als ein weiteres Verfahren der Nierenschädigung wurde schließlich noch die Implantation eines DOCA-Pellets und einer Angiotensin II-Pumpe nach Uninephrektomie ausgewählt, denn auch für diesen Ansatz war eine Nierenschädigung mit Proteinurieentwicklung beschrieben worden (Kirchhoff F et al., 2008). Für den Versuch wurden vier BL/6 Mäuse des Genotyps *Lmx1b*^{+/-} und vier vom Genotyp *Lmx1b*^{+/+} dem unter 2.2.4.C beschriebenen Verfahren unterzogen. Nach den unter 3.1.1 beschriebenen Unterschieden bei Injektion von Anti-GBM-Serum bei Mäusen aus der gleichen Linie wurde ein ähnliches Verhalten bei diesem Schädigungsmodell erwartet. Doch anders als von F. Kirchhoff et al. (2008) vorbeschrieben, konnten wir die Entwicklung von Nierenversagen bei diesem Versuchsprotokoll nicht reproduzieren: Bei keinem der beiden Genotypen kam es zu einer Proteinurie (s. Abb. 19) und auch lichtmikroskopisch war keine Schädigung der glomerulären Struktur sichtbar. Der Grund für dieses völlig fehlende Ansprechen bleibt unklar, eine

mögliche Erklärung wäre die mangelhafte Auflösung des subkutan implantierten DOCA-Pellets.

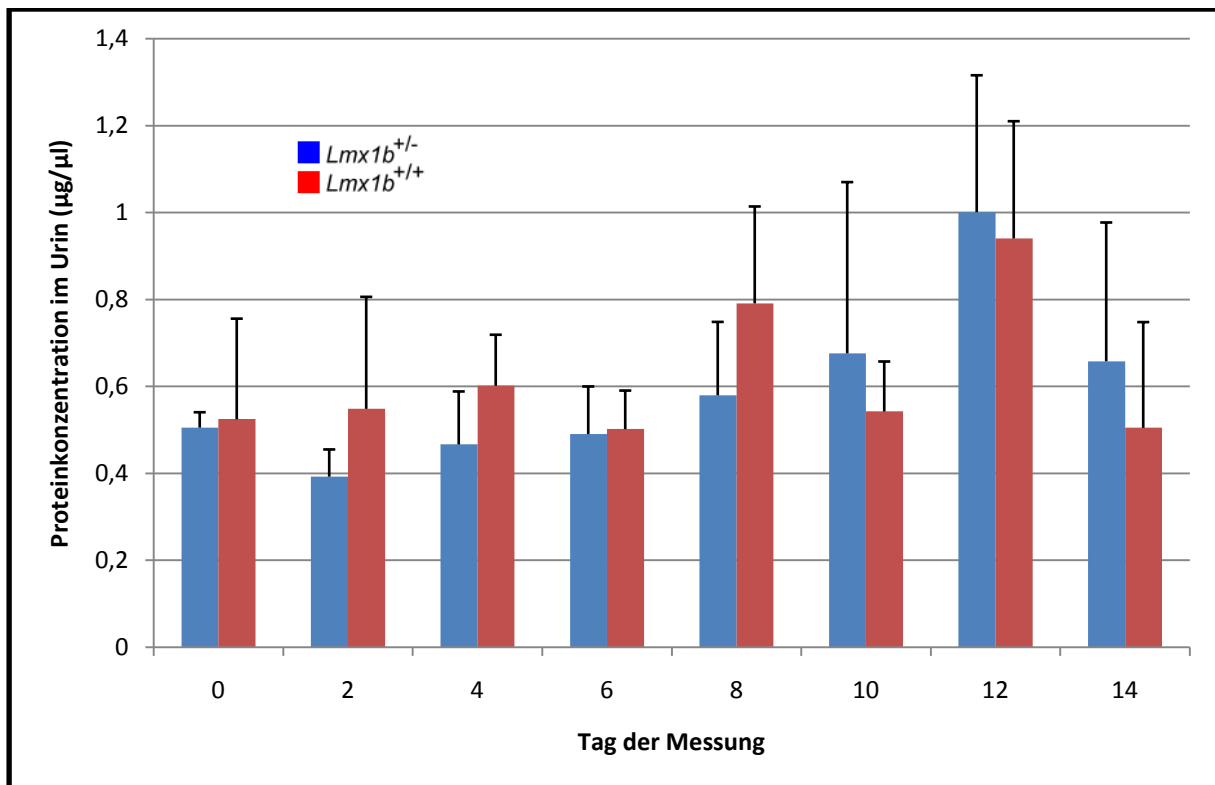


Abb. 19: Proteinkonzentrationen im Urin nach Uninephrektomie und Implantation eines DOCA-Pellets sowie einer Angiotensin II Pumpe (Mittelwerte + Standardabweichung). Anders als in der Literatur beschrieben kam es im Verlauf der 14-tägigen Beobachtungsphase zu keiner Proteinurieentwicklung (n = 4).

3.4 Überlebenskurven für Mäuse verschiedener Genotypen aus der Linie *Rb-lox3* (926) x *Lmx1b*^{2loxP} x P2.5-Cre

Mit diesem Versuch sollte eine mögliche Wechselwirkung zwischen *Lmx1b* und pRb gefunden werden. Dazu sollten die Überlebenskurven von Mäusen mit podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* und *Rb* mit solchen verglichen werden, bei denen nur eines der beiden Gene inaktiviert wurde. Aus Unterschieden in ihrem mittleren Überleben könnte man dann Rückschlüsse auf mögliche Wechselwirkungen ziehen. Die Beschreibung des Verfahrens zur Gewinnung der Überlebenskurven findet sich unter 2.2.4.D. Insgesamt wurden ca. 130 Mäuse genotypisiert und beobachtet.

Zunächst konnte die bereits bekannte Tatsache bestätigt werden, dass Mäuse vom Genotyp $Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ innerhalb von höchstens drei Wochen versterben (s. Abb. 20). Erstaunlicherweise überleben Mäuse des Genotyps $Rb^{+/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ signifikant länger als solche des Genotyps $Rb^{+/+} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ ($p = 0,007$). Dagegen besteht kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den Genotypen $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ und $Rb^{+/+} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ ($p = 0,104$) und den Genotypen $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ und $Rb^{+/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ ($p = 0,414$).

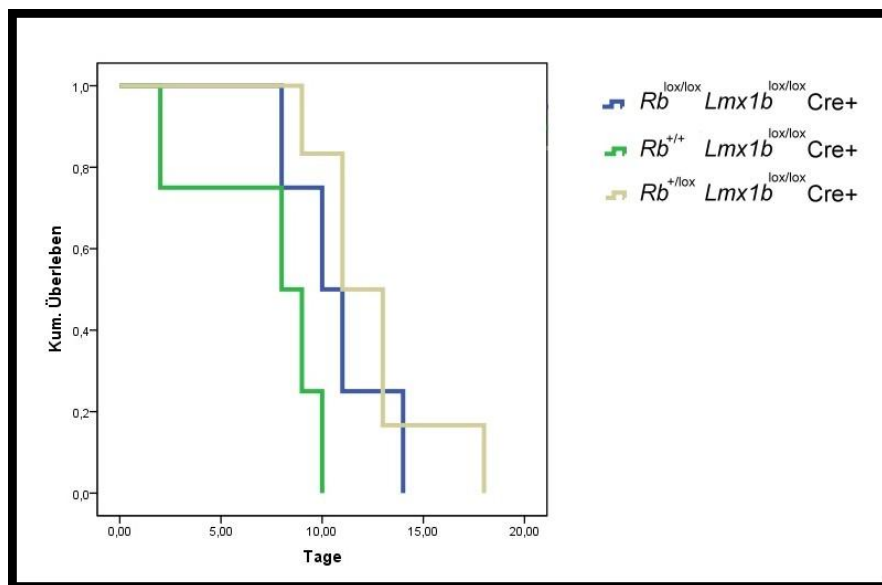


Abb. 20: Einfluss des *Rb*-Status auf das Überleben von Mäusen des Genotyps $Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+. Mäuse des Genotyps $Rb^{+/+} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+ zeigen ein signifikant kürzeres Überleben als diejenigen des Genotyps $Rb^{+/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+. Im Vergleich der anderen Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im mittleren Überleben. ($Rb^{lox/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+: $n = 4$. $Rb^{+/+} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+: $n = 4$. $Rb^{+/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre+: $n = 6$).

Vor allem von Interesse war es jedoch, einen eventuellen Zusammenhang von *Lmx1b* und *Rb* im Zellzyklus zu erkennen, weshalb ein besonderes Augenmerk auf den $Rb^{+/+} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+ Mäusen, den $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/+}$ Cre+ Mäusen und den $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+ Mäusen lag. Von den Mäusen mit lediglich einem geflochten Allel für *Lmx1b* und Positivität für Cre ist bekannt, dass sie in ihrem Überleben nicht beeinträchtigt sind, was auch in diesem Versuch bestätigt werden konnte. Das gleiche gilt für Mäuse mit einem oder zwei geflochten Allelen für *Rb* und Positivität für Cre (s. Abb. 21). Sie alle zeigen keinen signifikanten Unterschied im Überleben im Vergleich zu Tieren mit ausschließlich Wildtyp-Allelen.

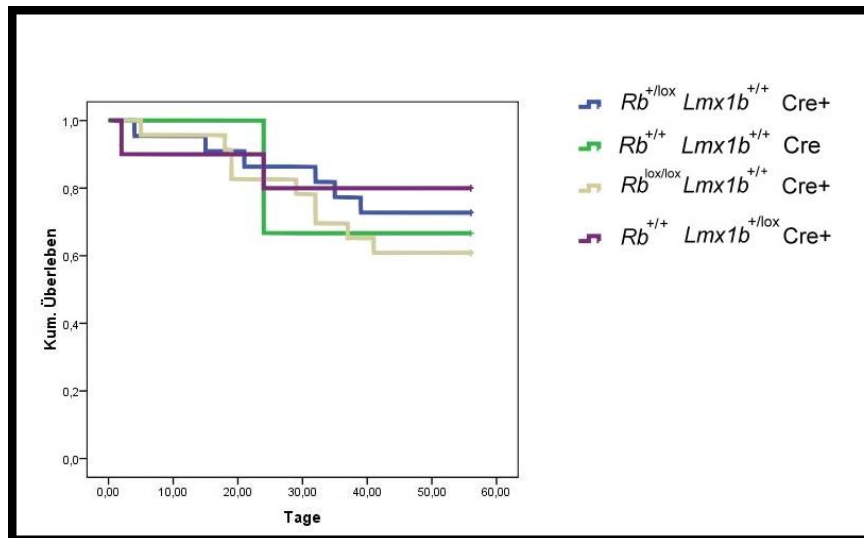


Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurven für Mäuse der Genotypen $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/+} Cre+$, $Rb^{+/+} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ und $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/+} Cre+$ im Vergleich zu Tieren mit zwei Wildtypallelen für *Rb* und *Lmx1b*. Das Überleben dieser drei Gruppen unterscheidet sich nicht signifikant von dem von Mäusen mit nur Wildtypallelen ($Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/+} Cre+$; n = 23. $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/+} Cre+$; n = 24. $Rb^{+/+} Lmx1b^{+/lox} Cre+$; n = 10. $Rb^{+/+} Lmx1b^{+/+} Cre+$; n = 3).

Wäre das Überleben von Mäusen des Genotyps $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ nun deutlich schlechter als das der beiden anderen Genotypen, so würde dies für einen Zusammenhang der beiden Gene sprechen. Tatsächlich zeigt sich in der Kaplan-Meier-Kurve eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Gruppe (s. Abb. 22).

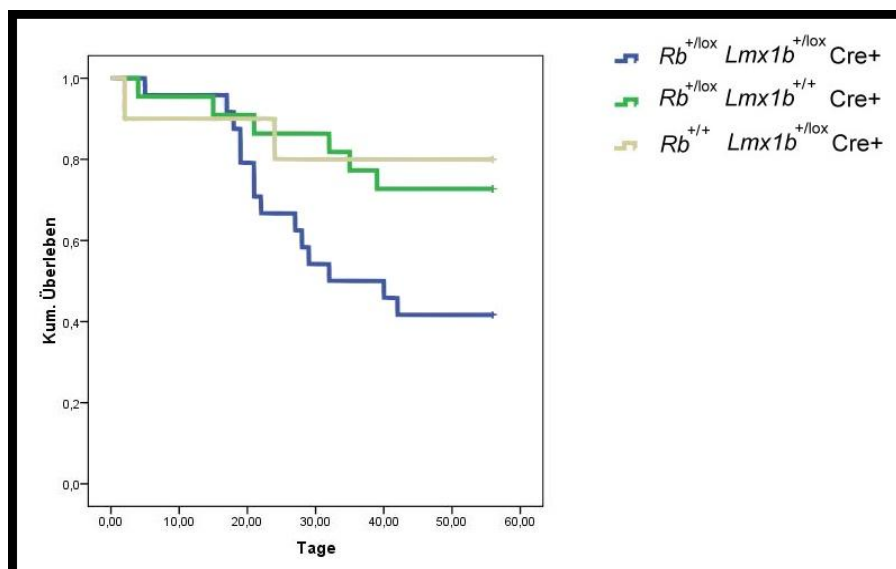


Abb. 22: Überleben von Mäusen mit einem geflochtenen Allel für *Rb* oder *Lmx1b* im Vergleich mit dem von Mäusen mit einem geflochtenen Allel für beide Gene. Man sieht einen deutlichen Abfall der Überlebenskurve der $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ Mäuse im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. ($Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$; n = 25. $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/+} Cre+$; n = 23. $Rb^{+/+} Lmx1b^{+/lox} Cre+$; n = 10).

Bei Anwendung des Log-Rank-Tests ergibt sich bei Vergleich der Gruppe $Rb^{+/+} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ mit der Gruppe $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ ein $p = 0,075$ und bei Vergleich der Gruppe $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/+} Cre+$ mit der Gruppe $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ ein $p = 0,036$. Somit ist der Unterschied im ersten Fall mit $p = 7,5\%$ noch nicht signifikant, aber im zweiten Fall mit $p = 3,6\%$ schon. Auch die elektronenmikroskopischen Bilder der Glomeruli von $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ Mäusen zeigen Auffälligkeiten in Form einer teilweise verdickten glomerulären Basalmembran und Podozyten mit auffällig aufgelockerter Binnenstruktur und filiformen Fortsätzen, die teils der GBM breitbasig aufsitzen. Im subkapsulären Raum findet man ausgefallenes Protein (Abb. 23).

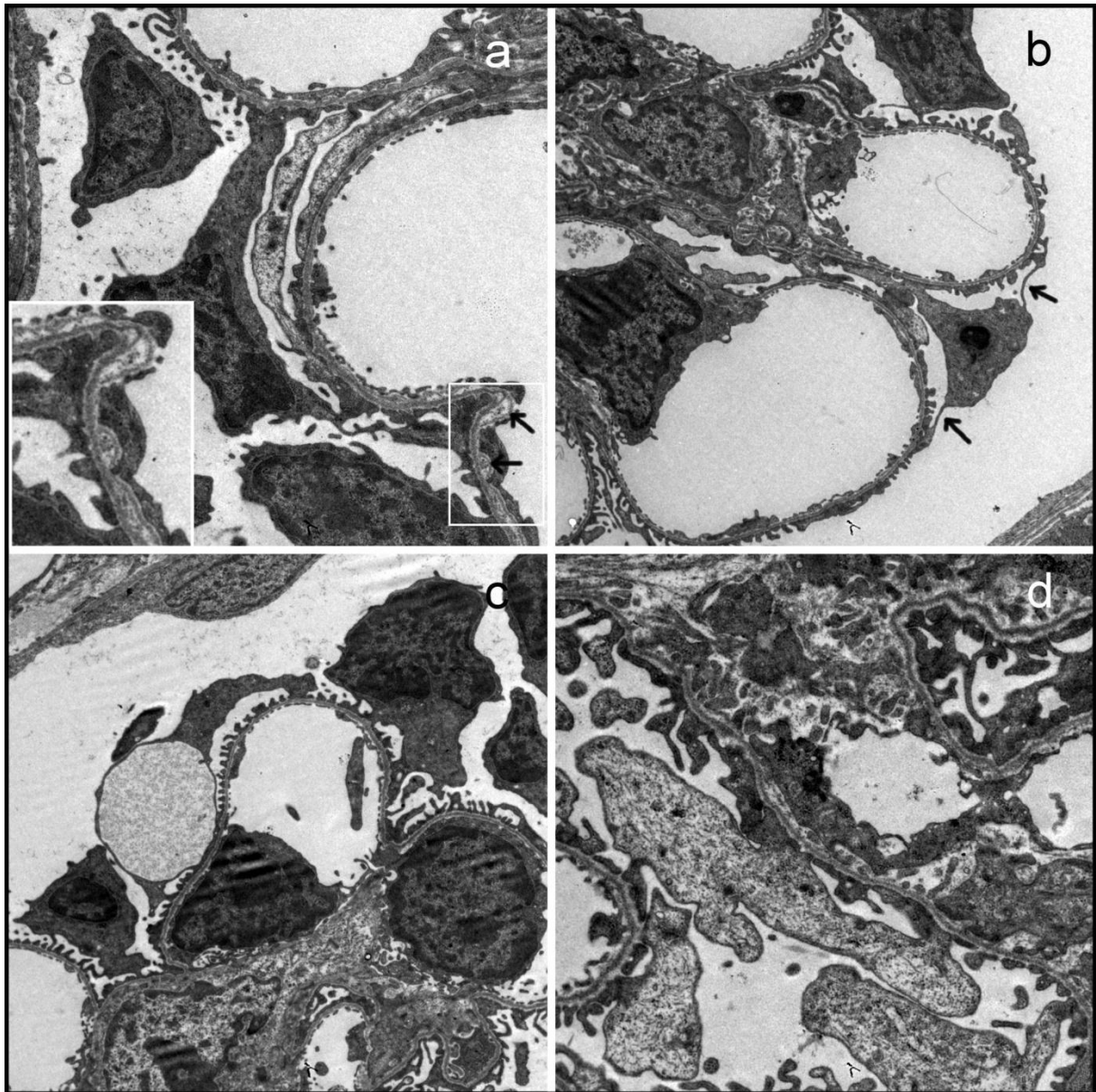


Abb. 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Glomeruli einer $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+ Maus (Alter 20 Tage). a) Man sieht einen Podozytenfortsatz mit deutlich aufgelockerter Struktur, der zudem der GBM breitbasig aufsitzt. An zwei Stellen (Pfeile) ist die GBM gesplittet (Vergrößerung 4.400x). b) Der Podozyt zeigt filiforme Fortsätze (Pfeile), die an zwei verschiedenen Kapillaren andocken (Vergrößerung 3.000x). c) Der in der Bildmitte gelegene Podozyt präsentiert eine große aufgelockerte Struktur im Zellkörper (Vergrößerung 3.000x). d) Breitbasig aufsitzende Podozytenfortsätze mit aufgelockertem Zytoplasma. Nicht so gut zu erkennen ist in den Aufnahmen das im subkapsulären Raum ausgefallene Protein (Vergrößerung 7.000x).

Bei der weiteren Analyse sehr auffällig ist die schlechte Lebenserwartung von $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre- Mäusen, die wegen der Negativität für Cre schwer erklärbar ist. Zwar war in dieser Gruppe die Fallzahl mit nur sechs Mäusen sehr gering (der Versuch hatte sich hauptsächlich auf Mäuse mit Positivität für Cre konzentriert), aber trotzdem ist der Unterschied zwischen den $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre- Mäusen und den $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+ Mäusen mit einem $p = 0,017$ signifikant (s. Abb. 24).

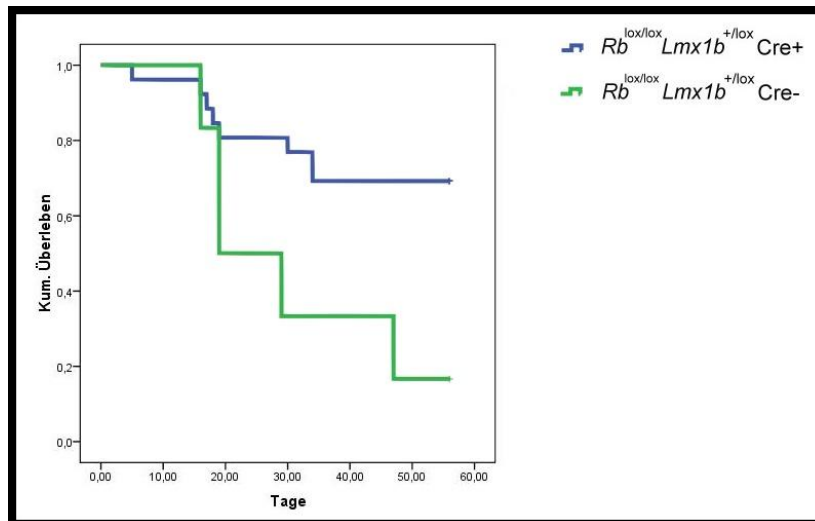


Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurven weiterer Genotypen. Erstaunlicherweise ist das Überleben beim Genotyp $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+ normal und das des Genotyps $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre- sehr schlecht. Bei letzterem könnte die Ursache in der geringen Fallzahl von nur sechs Mäusen liegen, wogegen aber auch der elektronenmikroskopische Befund spricht (siehe unten) ($Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+: $n = 26$. $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre-: $n = 6$).

Hinzu kommt die Tatsache, dass die elektronenmikroskopischen Bilder einer $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre- Maus nahezu die gleichen Auffälligkeiten zeigt (s. Abb. 25) wie oben für die Nieren der $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox}$ Cre+ Mäuse beschrieben. Daraus ergibt sich eher die Schlussfolgerung, dass die alleinige Insertion von *loxP*-Stellen in die beiden Gene in Abwesenheit von Cre vielleicht doch nicht völlig bedeutungslos für den Phänotyp ist, wie bisher angenommen. Doch reicht dieser einmalige Befund sicher noch nicht für sichere Aussagen diesbezüglich aus. Zuletzt noch Gegenstand der Untersuchung war das Überleben von Mäusen des Genotyps $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/+}$ Cre+, da bei früheren Beobachtungen der Eindruck entstanden war, diese Mäuse würden frühzeitig sterben. Dies konnte nicht bestätigt werden, der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurve war völlig normal. Insgesamt zeigt sich

ein teilweise widersprüchliches Bild mit interessanten Tendenzen, die in weiteren Untersuchungen vielleicht noch besser abgeklärt werden können.

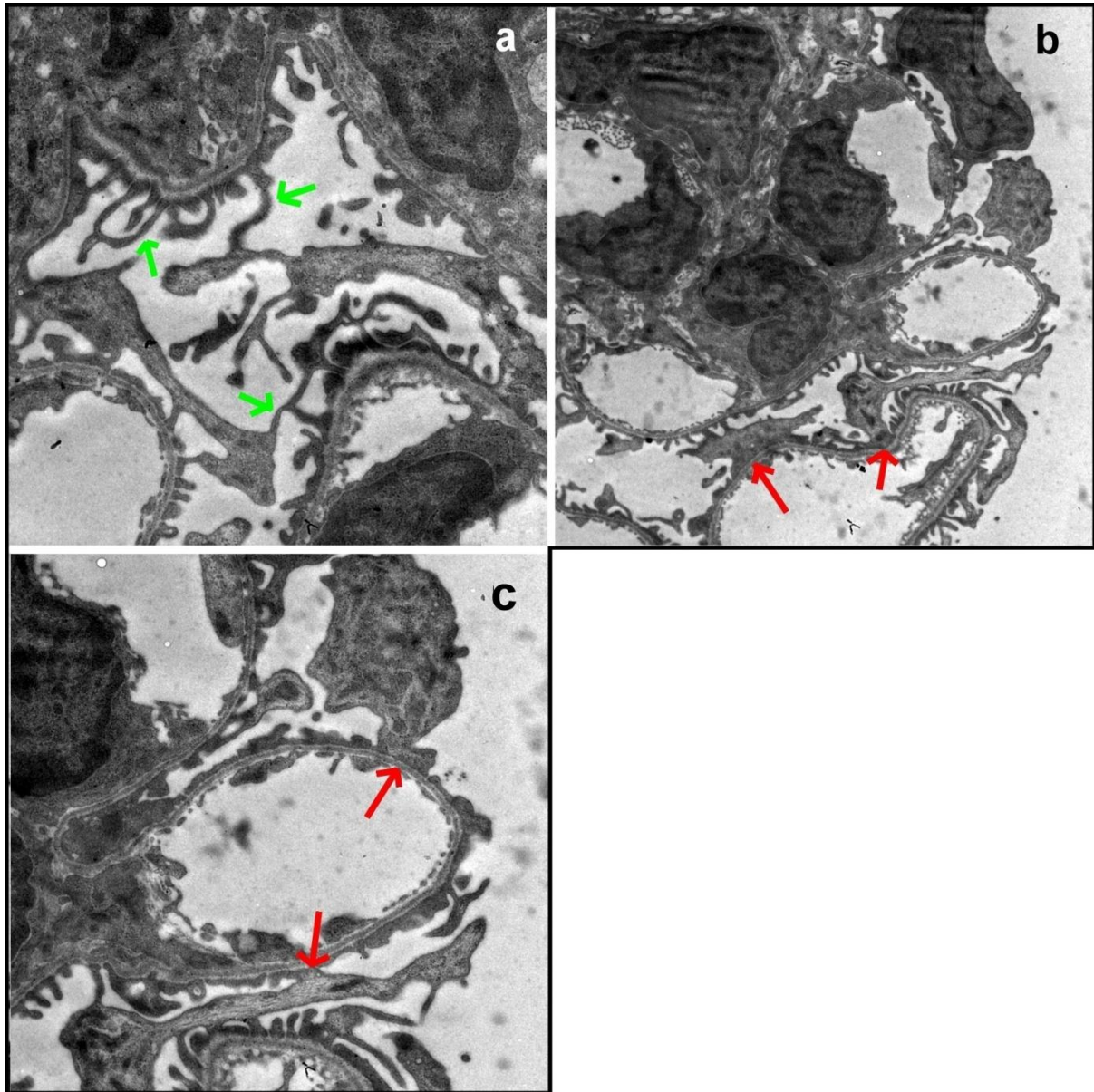


Abb. 25: EM-Bilder einer Niere einer $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{lox/lox}$ Cre- Maus (Alter 1 Monat). a) Man sieht zahlreiche filiforme Fortsätze der Podozyten (grüne Pfeile; Vergrößerung 7.000x). b) (Vergrößerung 3.000x) und c) (Vergrößerung 7.000x): Zum Teil breitbasig aufsitzende Podozytenfortsätze (rote Pfeile).

3.5 Auswertung des Gen Chips Affymetrix Mouse Genome 430 2.0

3.5.1 Gene mit deutlicher Abnahme ihrer Expression

Über die durch *Lmx1b* regulierten Gene ist bisher noch wenig bekannt, deshalb sollten mittels Analyse der mRNA aus Glomeruli von Mäusen mit induzierbarer podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* mögliche Kandidatengene identifiziert werden. Untersucht wurde die Veränderung der Genexpression einen Tag, drei, fünf und sieben Tage nach Induktion von rtTA positiven, Cre positiven, *Lmx1b*^{lox/lox} Mäusen und Isolation der RNA aus ihren Glomeruli (s. 2.2.3). Bei der Auswertung der vom Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik (Biopark Regensburg) uns zur Verfügung gestellten Excel-Tabelle wurden zunächst diejenigen Gene herausgesucht, die einen deutlichen Abfall in der Expression zeigten. Die folgende Tabelle (Tab. 1) listet die einzelnen Gene, die Absolutwerte der gemessenen RNA sowie die logarithmische Veränderung im Vergleich zum Tag 0 dar. Im Anschluss daran werden wichtige Funktionen der einzelnen Genprodukte kurz erläutert.

Gen Symbol	d0_Signal	d1_vs_d0_Signal	d3_vs_d0_Signal	d5_vs_d0_Signal	d7_vs_d0_Signal	d1_vs_d0_Signal Log Ratio	d1_vs_d0_Change	d3_vs_d0_Signal Log Ratio	d3_vs_d0_Change	d5_vs_d0_Signal Log Ratio	d5_vs_d0_Change	d7_vs_d0_Signal Log Ratio	d7_vs_d0_Change
Ccl3	611,9	170,4	185,2	2,3	43,3	-1,8	D	-1,4	D	-8,1	D	-3,7	D
Cd244	203,8	174,7	171,4	41,9	75,2	-0,2	NC	-0,3	NC	-2,5	D	-1,6	D
Cd44	608,9	530,4	495,5	129,2	188,7	-0,3	NC	-0,3	MD	-2,5	D	-1,9	D
Cd86	191	271,4	228,1	37,1	51,6	0,5	NC	0,2	NC	-2,2	D	-1,5	D
Clec4a3	1322,7	1150,8	1051,5	290,3	358,6	-0,3	D	-0,4	D	-2,2	D	-1,8	D
Coro1a	1754,9	1605	1405,6	424,7	460,6	-0,2	NC	-0,2	D	-2,1	D	-1,9	D
Cxcl10 /// LOC100045000	1020	1147,4	734,8	286,2	358,1	0	NC	-0,5	D	-2,2	D	-1,7	D
Cxcl2	822,1	499,1	454,3	79,3	288,5	-0,9	D	-0,8	D	-3,5	D	-1,6	D
Edg8	157,2	88,9	100	24,3	31,2	-0,9	D	-0,6	D	-2,8	D	-2,8	D
Fcgr1	369,7	319,1	373,1	69,7	70,6	0,1	NC	0	NC	-2,4	D	-2,1	D
Fcgr3	1119,1	1079,8	1054,8	229,5	356,9	-0,1	NC	0	NC	-2,4	D	-1,7	D
Fcgr4	1885,8	1179,1	1533,9	299,2	560,6	-0,7	D	-0,5	D	-3	D	-1,8	D
Gimap5	1438,1	652,3	1355,3	631,3	662,5	-1,2	D	-0,3	D	-1,2	D	-1,3	D
Hspa1a	5350,3	655,9	1440,9	701,8	471,7	-3,3	D	-2,1	D	-3,2	D	-3,6	D
Hspa1b	9980,3	989,4	1771	1396,1	920,6	-3,2	D	-2,4	D	-2,6	D	-3,3	D
Ifi202b	901,4	762,4	657,7	0,6	1,1	-0,2	NC	-0,4	D	-10,9	D	-10	D
Il10	89,9	71,4	73,4	7,8	29,7	-0,4	NC	-0,5	NC	-3,5	D	-2,2	D
Irg1	84	121,9	82,7	0,7	7,6	0,2	NC	-0,3	NC	-6	D	-4,3	D
Mmp13	998	1013,2	884,9	73,4	137,2	0,2	NC	-0,1	NC	-3,7	D	-2,7	D
Pcdhb4	54,3	26,2	29,5	3,9	1,5	-1,2	D	-1	D	-1,8	D	-5,2	D

Pilra	802,7	596,7	551,4	124,1	127,2	-0,4	NC	-0,5	D	-2,9	D	-2,4	D
Ppbbp	250,3	80,7	95,1	73,2	49,7	-1,7	D	-1,3	D	-2,4	D	-3	D
Rgs1	1193,8	495,6	912,5	89,3	138	-1,2	D	-0,3	D	-3,8	D	-3,3	D
Tlr7	77,7	77,5	83,1	21,6	42,2	-0,6	D	-0,3	NC	-1,9	D	-1,3	D
Trem14	1316,3	1150,1	979,7	168,9	290,3	-0,2	NC	-0,2	D	-3,2	D	-2,5	D
Tyrobp	4443,2	3720,2	3757,4	950,5	1144,8	-0,2	D	-0,2	D	-2,2	D	-1,9	D
Myo1f	488	516,7	327,1	116,6	142,5	0,1	NC	0	NC	-1,9	D	-1,8	D

Tab. 1: Ausgewählte Gene mit deutlicher Expressionsabnahme 1, 3, 5 und 7 Tage nach Induktion. Die Gene sind mit ihrem Symbol aufgeführt. Es folgen die Absolutwerte der RNA an Tag 0, 1, 3, 5, 7. Anschließend ist die Veränderung der jeweiligen Werte im Verhältnis zu Tag 0 als Logarithmus zur Basis 2 angegeben. Die Buchstaben nach den logarithmischen Veränderungen bedeuten „D“ für „Decrease“ bzw. „MD“ für „Minimal Decrease“ und „NC“ für „No change“.

Zur Funktion der einzelnen Genprodukte:

1. Ccl3 = Chemokine (C-C motif) ligand 3:

Ccl3 wird zusammen mit anderen Chemokinen durch IL-17 induziert, von dem bereits bekannt ist, dass es eine Rolle bei Glomerulonephritiden spielt. Als Folge der Chemokinbildung kommt es zur Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen (Paust HJ et al., 2009). Auch vom Modell der nekrotisierenden Glomerulonephritis an Mäusen kennt man eine gesteigerte Bildung von Ccl3 am ersten Tag nach Induktion der Glomerulonephritis mit der Folge einer Leukozyteninfiltration (van der Veen et al., 2009).

2. Cd244 = CD244 natural killer cell receptor 2B4:

CD244 befindet sich an der Zelloberfläche aller NK-Zellen, Monozyten und basophilen Granulozyten, wobei zwei verschiedene Isoformen existieren. Die Bedeutung von CD244 liegt in der NK-Zell-Aktivierung (Mathew SO et al., 2009), es gibt aber auch kostimulatorische Effekte in humanen T-Zellen (Altvater B et al., 2009). Hinsichtlich der Funktion im Podozyten ist bisher nichts bekannt.

3. Cd44 = CD44 antigen:

CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül (Andreadis D et al., 2007), das in Verbindung mit seinem wichtigsten Liganden Hyaluronsäure mesenchymale Stammzellen rekrutiert und so die Regeneration nach Nierenschädigung fördert (Herrera MB et al., 2007). Zum Beispiel wird es

tubuloepithelial bei autoimmunen Nierenschädigungen und auch nach renaler Ischämie und Reperfusion deutlich mehr produziert (Kocak B et al., 2009).

4. Cd86 = CD86 antigen:

Cd86 wird vor allem in extravasalen Monozyten und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (Paulsson JM et al., 2009). Es dient als kostimulatorisches Molekül, wenn nach Aufnahme und Präsentation von Antigenen z. B. durch dendritische Zellen die Proliferation von Antigen-spezifischen CD4 positiven Zellen angestoßen wird (Edgtton KI et al., 2008), weshalb es auch ein potentiell Ziel für Pharmaka bei Transplantatabstoßung ist (Weaver TA et al., 2008). Die Bedeutung von CD86 im Podozyten ist noch ungeklärt.

5. Clec4a3 = C-type lectin domain family 4 member a3:

Ein anderer Name für *Clec4a3* ist *Dcir3*, was die Abkürzung für „dendritic cell inhibitory receptor 3“ ist. Über die genaue Funktion ist bisher noch nichts bekannt.

6. Coro1a = coronin, actin binding protein 1A:

Coronin bindet an F-Aktin und ist beteiligt an Proliferation, Lokomotion, Phagozytose und der Bildung von Superoxiden (Xavier CP et al., 2009). Über die Mobilisation von Calcium aus intrazellulären Speichern in T-Lymphozyten wirkt es an der T-Zell-Proliferation, am T-Zell-Überleben und an der Il-2 Produktion mit (Mueller P et al., 2008). Ferner inhibiert Coronin in Makrophagen die Phagosomenreifung und unterdrückt die TLR-vermittelte Signalaktivierung (Tanigawa K et al., 2009).

7. Cxcl10 = chemokine (C-X-C motif) ligand 10:

Cxcl10 ist ein antiangiogenetisch wirkendes Protein (Datta D et al., 2007), das an den Rezeptor CXCR3 bindet, was zur Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Subpopulationen von Leukozyten und damit zu Entzündungsreaktionen führt (Trotta T et al., 2009). Da Cxcl10 durch Interferon γ induziert werden kann, wird auch eine Beteiligung an Autoimmunerkrankungen diskutiert (Bauer JW et al., 2009). In der Niere wird eine Beteiligung des Proteins an der Aufrechterhaltung der Funktionen des Schlitzdiaphragmas durch Regulation der Zellzyklusbalance der Podozyten angenommen (Kawachi H et al., 2009).

8. Cxcl2 = chemokine (C-X-C motif) ligand 2:

Nach Nierenschädigungen wie Ischämie und nachfolgende Reperfusion werden über Aktivierung des alternativen Weges der Komplementkaskade, speziell über C3a, unter anderem die Chemokine Cxcl1 und 2 gebildet und so eine systemische Immunantwort eingeleitet (Thurman JM et al., 2007). Zusätzlich ist bekannt, dass Cxcl2 die Extravasation von Neutrophilen fördert (Roche JK et al., 2007) und dass die entzündlichen Reaktionen in der Niere nach Antikörper-Deposition im Glomerulus zumindest zum Teil über Cxcl1 und 2 vermittelt werden (Brown HJ et al., 2007).

9. Edg8 = endothelial differentiation, sphingolipid G-protein coupled receptor 8:

Mit Sphingosin-1-Phosphat als seinem wichtigsten Liganden stimuliert der G-Protein gekoppelte Rezeptor Edg8 das Zellwachstum, verhindert Apoptose, reguliert das Aktin-Zytoskelett, moduliert die Zellgestalt und wirkt an Zellmigration und –invasion mit (Takuwa Y et al., 2002). Aufgrund dieser Funktionen spielt er eine wesentliche Rolle bei Entzündungen, Tumorzell dissemination und Gefäßremodelling.

10. Fcgr1 = Fc receptor, IgG, high affinity I

Fcgr1 ist ein spezifischer Rezeptor für IgG2a (Baudino L et al., 2008) und vermittelt die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie Leukotrien B4 und Prostaglandin E2 (Tay HK et al., 2004). Nach Injektion von Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran scheint er an der CRP-vermittelten Protektion der Niere mitzuwirken (Rodriguez W et al., 2007). Die Funktion von Fcgr1 speziell im Podozyten ist noch unklar.

11. Fcgr3 = Fc receptor, IgG, low affinity III:

Spezifische Liganden für Fcgr3 sind IgG1, IgG2a und IgG2b (Baudino L et al., 2008), wobei die Bildung von Il-10 nur durch Bindung von IgG1 induziert wird (Thomas BN et al., 2008). Eine weitere Funktion des Rezeptors besteht in der immunkomplex-induzierten Aktivierung von Neutrophilen (Jakus Z et al., 2008) und der Beschleunigung der Entwicklung eines Nierenversagens nach Injektion von Anti-GBM-Serum (Fujii T et al., 2003). Ebenso wie bei Fcgr1 ist auch bei Fcgr3 seine Funktion im Podozyten noch nicht erforscht.

12. Fcgr4 = Fc receptor, IgG, low affinity IV:

Fcgr4 wird in Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und zeigt eine geringe Affinität für alle IgE-Subtypen (Mancardi DA et al., 2008), bindet aber auch IgG2a und IgG2b (Baudino et al., 2008). Bei Aktivierung des Rezeptors werden Makrophagen zur Zytokinausschüttung, Phagozytose und Antigenpräsentation stimuliert (Hirano M et al., 2007) und auch Neutrophile können aktiviert werden (Jakus Z et al., 2008). Auch hier ist die Bedeutung des Proteins für den Podozyten unklar.

13. Gimap5 = GTPase, IMAP family member 5:

Das kodierte Protein ist ein bedeutsamer Regulator der Ca^{2+} -Signalwege in T-Lymphozyten, weshalb ein mutiertes Gen über gestörte Signalwege zur Apoptose (Ilangumaran S et al., 2009) und damit zur Lymphopenie (Rutledge EA et al., 2009) führt. Ferner kommt es bei Verlust einer Genkopie zu einer Aktivierung von NF- κ B (Kupfer R et al., 2007).

14. Hspa1a = heat shock protein 1A:

Das Hitzeschockprotein kann an Endothel binden und so atheroprotektiv wirken (Pockley AG et al., 2009), außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen (Kee C et al., 2008).

15. Hspa1b = heat shock protein 1B:

Über dieses Hitzeschockprotein ist außer seiner Bedeutung bei Immunreaktionen (Kee C et al., 2008) bisher kaum etwas bekannt.

16. Ifi202b = interferon activated gene 202B = lupus susceptibility factor:

Wie der Name bereits impliziert, wird Ifi202b durch Interferon induziert (Choubey D et al., 2008), aber auch Stimulation von T-Zellen führt zu einer Aufregulation der Genexpression (Chen J et al., 2008). Ifi202b ist ein wichtiger Aktivator von NF- κ B, ist beteiligt an der IL-12 Bildung (Yamauchi M et al., 2007) und kann schnell und stabil fremde dsDNA binden und so die DNA-induzierte Caspasen-Aktivierung inhibieren (Roberts TL et al., 2009). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Wechselwirkung mit Rb, das einerseits die Expression von Ifi202b steigert, andererseits selbst von Ifi202b gebunden wird, was zu einer Verlangsamung des Zellwachstums führt (Xin H et al., 2003).

17. Il10 = interleukin 10:

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das durch seine Wirkung auf T-Zellen dort die Expression von Transkriptionsfaktoren aufrecht erhält (Murai M et al., 2009). Ein bestimmter Genpolymorphismus für IL-10 korreliert mit einer häufig wiederkehrenden IgA-Nephropathie (Bantis C et al., 2008). Hinsichtlich der Funktion speziell im Podozyten ist nichts bekannt.

18. Irg1 = immunoresponsive gene 1:

In Makrophagen wird Irg1 bei Infektionen durch IFN- γ und TNF hochreguliert, ebenso durch proinflammatorische Zytokine und Bindung von TLR-Agonisten an ihre Rezeptoren (Degrandi D et al., 2009). Auch LPS kann Irg1 induzieren (Lee CG et al., 1995). Worin die Bedeutung von Irg1 im Podozyten liegt, ist noch unklar.

19. Mmp13 = matrix metalloproteinase 13:

Diese Metalloproteinase besitzt eine breite Substratspezifität und wird im Wesentlichen in pathologischen Situationen wie chronischen Entzündungen oder Tumorerkrankungen exprimiert (Yu Q et al., 2003).

20. Pcdhb4 = protocadherin beta 4:

Von dieser Proteinfamilie ist bisher lediglich ihre Bedeutung für die neuronale Plastizität bekannt (Hilschmann N et al., 2001).

21. Pilra = paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha:

Pilra wird hauptsächlich in Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen gebildet und kann deren Funktionen unterdrücken (Tabata S et al., 2008). Auf der anderen Seite ermöglicht es bestimmten Viren wie HSV-1 das Eindringen in ihre Zielzellen (Arii J et al., 2009). Unklar ist, welche Funktionen Pilra im Podozyten wahrnimmt.

22. Ppbb = pro-platelet basic protein = CXCL7 = CTAP3:

Als Chemokin fördert Ppbb die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel und ihre Transmigration (Schenk BI et al., 2002). In der Niere bewirkt es über gesteigerte Expression

von Matrixmetalloprotease 9 und endothelialen sowie mesenchymalen Markern eine angiogenetische Antwort auf Verletzungen der Nierenstruktur (Levashova ZB et al., 2007).

23. Rgs1 = regulator of G-protein signaling 1:

Rgs1 erhöht die GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen (Smith B et al., 2009). Seine Expression wird durch TLR-Liganden moduliert, was bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen von Bedeutung ist (Riekenberg S et al., 2009).

24. Tlr7 = toll-like receptor 7:

TLR7 ist in der Lage, bakterielle RNA und DNA zu erkennen (Eberle F et al., 2009), und ein TLR7/9 abhängiger Pfad führt bei bakterieller Infektion zur Bildung von IFN- α in humanen Immunzellen (Petzke MM et al., 2009). Vermutlich sind TLRs auch an der Entstehung Immunkomplex-vermittelter Glomerulonephritiden beteiligt, denn man weiß, dass TLR7 eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Autoantikörperproduktion im Mausmodell der Lupusnephritis spielt (Smith KD, 2009).

25. Trem14 = triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4:

Dieses Molekül wird z. B. auf Makrophagen produziert und kann in Verbindung mit dem Adaptormolekül DNAX-Aktivierungsprotein (12 kDa) tote Zellen erkennen (Hemmi H et al., 2009). Hinsichtlich seiner Funktion im Podozyten ist nichts bekannt.

26. Tyrobp = TYRO protein tyrosine kinase binding protein:

Tyrobp-gekoppelte Rezeptoren beeinflussen Signale von TLRs, Integrinen und Rezeptoren für Zytokine und Wachstumsfaktoren (McVicar DW et al., 2009), wobei die Tyrobp-gekoppelten Rezeptoren sowohl körpereigene als auch körperfremde Liganden binden können (Lanier LL, 2009). Ihre Bedeutung für Immunreaktionen ist also deutlich zu erkennen. Des Weiteren ist Tyrobp zusammen mit anderen Proteinen für die Fusion von Makrophagen zu mehrkernigen Riesenzellen erforderlich (Helming L et al., 2008). Auch bei diesem Protein ist seine Funktion im Podozyten noch nicht erforscht.

27. Myo1f = myosin IF:

Hauptsächlich in den Zellen des Immunsystems exprimiert, ist Myo1f mitverantwortlich für Zelladhäsion und –motilität. Es ist mit zellmembrannahem Aktin assoziiert, das bei Myo1f-Defizienz ebenfalls reduziert ist (Kim SV et al., 2006).

Insgesamt zeigt sich in dieser Auflistung von Proteinen ein buntes Bild verschiedener Eigenschaften und Wirkungsweisen. Auffällig ist aber die hohe Zahl jener Proteine, die in der einen oder anderen Form an Immunreaktionen beteiligt sind, was eine Bedeutung von Lmx1b in der Immunregulation nahelegt. Einige weitere Moleküle sind von Bedeutung für Zelladhäsion und –motilität, sodass der Eindruck entsteht, dass auch hier Lmx1b von Bedeutung ist.

3.5.2 Gene mit deutlicher Zunahme ihrer Expression

Im zweiten Schritt wurden diejenigen Gene herausgesucht, deren Expression nach Ausschaltung von *Lmx1b* deutlich zugenommen hatte. Sie sind zunächst in Tab. 2 zusammengefasst dargestellt, im Anschluss folgt eine kurze Erläuterung ihrer jeweiligen Funktion.

Gen Symbol	d0_Signal	d1_vs_d0_Signal	d3_vs_d0_Signal	d5_vs_d0_Signal	d7_vs_d0_Signal	d1_vs_d0_Signal Log Ratio	d1_vs_d0_Change	d3_vs_d0_Signal Log Ratio	d3_vs_d0_Change	d5_vs_d0_Signal Log Ratio	d5_vs_d0_Change	d7_vs_d0_Signal Log Ratio	d7_vs_d0_Change
Adam10	151,8	533,4	383,3	493,3	406,8	2	I	1,5	I	1,7	I	1,5	I
Aqp3	17	81,6	32,9	108,9	99,6	2	I	0,5	I	2	I	2,1	I
Car15	789,3	1284,5	1063,4	2328,1	1986,8	0,9	I	0,7	I	1,6	I	1,5	I
Cdh1	489,2	1215,6	663,3	2152,1	1708	1,2	I	0,4	I	2	I	1,5	I
Cdo1	232,4	650,8	486,6	848,9	1830,7	1,7	I	1,3	I	2,1	I	3,1	I
Cldn11	0,5	2,1	10,5	8,6	21,1	1	NC	4,5	I	3,7	I	5	I
Cldn7	83,4	219,7	172,4	440,1	287,8	1,6	I	1,1	I	2,4	I	1,9	I
Cldn8	231,1	953,8	458,2	1415,6	1183,1	1,6	I	1	I	2,5	I	2,2	I
Dsg2	57,8	155,4	131,2	300,6	218,6	1,2	I	1,2	I	2,3	I	1,7	I
Dsp	714	1351,3	866,5	1180,1	1526,7	0,8	I	0,1	NC	0,6	I	1	I
Fgfr3	1673,4	2505,5	2519,5	2563	4106,8	0,7	I	0,7	I	0,7	I	1,5	I
Fgl2	31,7	207,8	43,4	104,9	186,1	2,5	I	1	I	1,8	I	2,6	I
Fkbp5	1005	1654,3	1328,4	1239,2	5494	0,9	I	0,5	I	0,4	I	2,7	I
Gja1	133,7	132,7	111,7	221,5	253,8	-0,2	NC	-0,3	NC	0,6	I	1,1	I
Gldc	125,7	432,1	302,1	649,2	692,4	1,8	I	1,6	I	2,6	I	2,5	I

Kif21a	110,5	231	172,8	295,8	231,3	0,7	I	0,5	I	1,5	I	1	I
Krt8	137,6	273,8	174,7	463,4	356,1	1,1	I	0,4	I	1,9	I	1,5	I
Mal2	44,7	141,1	70,2	217,2	152,7	1,8	I	1	MI	2,4	I	2	I
Myh11	285,7	453,2	340,4	529,4	765,6	0,9	I	0,3	I	1	I	1,5	I
Ptgfr	83,5	278,8	171,1	454,5	438,4	1,7	I	0,5	I	2,3	I	2,3	I
Ren1 /// Ren2	1840,3	8650,3	8059,2	10040	12265	2,3	I	2,2	I	2,6	I	2,8	I
Scg5	164,3	296,9	179,1	487,8	597,7	1,1	I	0,2	NC	1,7	I	2	I
Tagln	889,9	2008,3	1894,1	1952,7	8165	1,1	I	0,8	I	0,9	I	3,2	I
Tmem30b	121,5	282	213,2	583,2	531,2	1,5	I	0,6	I	2,2	I	2,1	I

Tab. 2: Gene mit deutlicher Expressionszunahme 1, 3, 5 und 7 Tage nach Ausschaltung von *Lmx1b*. Die Gene sind mit ihrem Symbol aufgeführt. Es folgen die Absolutwerte der gemessenen RNA an den Tagen 0, 1, 3, 5 und 7. Daran anschließend sind die Veränderungen im Verhältnis zu Tag 0, berechnet als Logarithmus zu Basis 2, angeben. Der Buchstabe „I“ steht für „Increase“, „MI“ für „Minimal Increase“ und „NC“ für „No change“.

Zur Funktion der einzelnen Genprodukte:

1. *Adam10* = a disintegrin and metallopeptidase domain 10:

Adam10 kann E-Cadherin (Dittmer A et al., 2009) und in vitro auch Kollagen IV (Millichip MI et al., 1998) spalten und fördert so die Migration von Zellen. In der Niere sind Adam10 und 17 verantwortlich für Zytokinausschüttungen, die zur Rekrutierung von Immunzellen in den Glomerulus und zur Proliferation und Migration mesangialer Zellen führen (Schramme A et al., 2008).

2. *Aqp3* = aquaporin 3:

Aquaporin 3 ist basolateral an den Hauptzellen des Sammelrohrs gelegen (Boone M et al., 2008) und transportiert Wasser, Harnstoff und Glycerin (MacIver B et al., 2009). Der Kanal kann durch Quecksilber und saures Milieu inhibiert werden. Vermutlich durch erleichterten Wassertransport in Lamellipodien erleichtert das Aquaporin die Zellmigration (Verkman AS, 2009). Auch eine Beteiligung an der Regulation der Proliferation von Sammelrohrzellen wird vermutet (Verkman AS, 2008). Über die Bedeutung von Aquaporin 3 im Podozyten ist noch nichts bekannt.

3. *Car15* = carbonic anhydrase 15:

Erkenntnisse über die Bedeutung der einzelnen Isotypen der Carboanhydrase gibt es bisher nur im Gastrointestinaltrakt. Allgemein bekannt ist die Mitwirkung von Carboanhydrase bei

Prozessen wie Säure- und Bikarbonatsekretion, Glukoneogenese und Harnstoffsynthese (Pan PW et al., 2007).

4. *Cdh1* = cadherin 1 = E-cadherin gene:

Cadherin 1 bildet auf Zelloberflächen funktionelle Komplexe mit Cateninen und trägt so zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und zur Zellmotilität bei (Van den Bossche J et al., 2009). Verlust oder Mutation von *Cdh1* begünstigt die Entstehung verschiedener Tumoren wie z. B. Insulinomen (Jia H et al., 2009). Die Beteiligung von P-Cadherin an der Ausbildung des glomerulären Schlitzdiaphragmas ist bekannt, ob auch Cadherin 1 im Podozyten eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

5. *Cdo1* = cysteine dioxygenase 1, cytosolic:

Cdo1 wirkt an der Synthese von Taurin mit, das als Schutz der Zellen gegen Stress dient (Honjoh KI et al., 2009), mehr ist über seine Funktionen noch nicht bekannt.

6. *Cldn11* = claudin 11:

Die Mitglieder der Claudin-Familie sind die Hauptkomponenten der Tight junctions. Claudin 11 ist dabei vor allem im proximalen und distalen Konvolut der Niere lokalisiert (Elkouby-Naor L et al., 2008). Die Bedeutung der Claudine 11, 7 und 8 im Podozyten ist noch nicht geklärt.

7. *Cldn7* = claudin 7:

Im Gegensatz zu Claudin 11 wird Claudin 7 vorwiegend im distalen Nephron exprimiert (Osunkoya AO et al., 2009). Es kann mit dem Adhäsionsmolekül EpCAM assoziieren und so Zell-Zell-Adhäsionen und die Resistenz gegen Apoptose beeinflussen (Ladwein M et al., 2005). Bei veränderter Claudin-Expression wird auch die Expression von E-Cadherin vermindert, was die Entstehung und Streuung von Tumoren durch Störung der Zelladhäsion fördert (Lioni M et al., 2007).

8. *Cldn8* = claudin 8:

Auch Claudin 8 ist eine Komponente von Tight junctions. Auffällig ist seine verminderte Expression in Tumorgewebe (Gröne J et al., 2007).

9. Dsg2 = desmoglein 2:

Desmoglein 2 ist ein transmembranäres Cadherin der desmosomalen Zell-Zell-Adhäsionsstruktur und wird in bestimmten Tumorgeweben stark überexprimiert (Brennan D et al., 2009). Ferner ist es beteiligt an der Apoptoseregulation während der physiologischen Entwicklung und bei Entzündungen (Nava P et al., 2007). In Podozyten wurden aber bisher keine desmosomalen Strukturen nachgewiesen, die Funktion von Desmoglein 2 im Podozyten ist damit unklar, das gleiche gilt für das im folgenden aufgeführte Protein Desmoplakin.

10. Dsp = Desmoplakin:

Auch Desmoplakin ist ein desmosomales Protein, das die Intermediärfilamente Keratin und Vimentin bindet (Stappenbeck TS et al., 1993), aber auch am Rearrangement des Mikrotubulus-Zytoskeletts mitwirkt (Lechler T et al., 2007). Mutationen von *Dsp* ebenso wie von *Dsg2* können Ursache verschiedener Kardiomyopathien wie der arrhythmogenen rechtsventrikulären Dysplasie sein (Herren T et al., 2009).

11. Fgfr3 = fibroblast growth factor receptor 3:

Der in der Niere hauptsächlich im proximalen Tubulus exprimierte (Liu S et al., 2008) Inhibitor der Zellproliferation (Sanchez CP et al., 2007) ist eine Rezeptortyrosinkinase, von der es aufgrund alternativen Splicings zwei Isoformen gibt (Tomlinson DC et al., 2005). Ein verändertes Verhältnis der beiden Isoformen kann man in bestimmten Tumoren finden. Im Glomerulus wird Fgfr3 eine wichtige Rolle beim Erhalt der strukturellen und funktionellen Integrität zugesprochen (Ford MD et al., 1997).

12. Fgl2 = fibrinogen-like protein 2:

Das Gen kodiert für eine Prothrombinase, eine Funktion besteht also in der vaskulären Thrombose- und Fibroseausbildung (Siu KL et al., 2009). Weiterhin inhibiert das von regulatorischen T-Zellen produzierte Protein die Proliferation und Reifung von T-Zellen (Liu H et al., 2008), weshalb es im Umkehrschluss bei Verminderung oder Fehlen von Fgl2 zu stärkerer T-Zellproliferation mit der Folge z. B. der Entwicklung einer autoimmunen Glomerulonephritis (Shalev I et al., 2008) kommt.

13. Fkbp5 = FK506 binding protein 5:

Die cis-trans Prolyl-Isomerase Fkbp5 spielt eine Rolle in der Immunregulation und grundlegenden zellulären Prozessen einschließlich Proteinfaltung und –transport. Sie bindet die Immunsuppressiva Rapamycin und FK506, interagiert mit dem Progesteronrezeptor und dem p23 Protein und wirkt als Co-Chaperon des Hitzeschockproteins Hsp90 bei der Regulation der Sensitivität des Glukokortikoidrezeptors (Binder EB, 2009). Sie ist außerdem beteiligt am NF-κB-Pfad (Jiang W et al., 2008).

14. Gja1 = gap junction protein, alpha1:

Gja1 ist ein Mitglied der Connexin-Familie und ein Bestandteil von Gap junctions. Die Offenheitswahrscheinlichkeit von Gja1 wird indirekt über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert (De Vuyst E et al., 2009). In der Niere dienen Gja1-haltige Gap junctions der Synchronisation der Aktivität der Sammelrohrzellen bei der Reaktion auf osmotische Veränderungen (Hills CE et al., 2006). Im Podozyten konnten allerdings keine Gap junctions nachgewiesen werden, welche Funktion Gja1 im Podozyten haben könnte, ist folglich unklar.

15. Gldc = glycine decarboxylase:

Mutationen im Gen der mitochondrial lokalisierten Gldc führen zur nicht-ketotischen Hyperglycinämie mit Akkumulation von Glycin in den Körperflüssigkeiten und zahlreichen neurologischen Symptomen (Kanno J et al., 2007). Über die Funktionen von Gldc in der Niere ist bisher nichts bekannt.

16. Kif21a = kinesin family member 21A:

Kif21a gehört zur Familie der Kinesine, Motorproteinen für den mikrotubulären Transport vom Mikrotubulus-Organisator-Zentrum zur Zellperipherie hin (Shen X et al., 2008). Insgesamt ist wenig über dieses Kinesin bekannt, man weiß lediglich, dass Mutationen zur kongenitalen Fibrose der extraokulären Muskulatur führen (Demer JL et al., 2005).

17. Krt8 = keratin 8:

Krt8 ist ein Mitglied der Typ III Keratine, die zusammen mit Typ I Keratinen die Intermediärfilamente in Epithelzellen bilden. Sie sind wichtig für die strukturelle Integrität

der Zelle, aber auch für die Signaltransduktion und Zelldifferenzierung. Wahrscheinlich sind Krt8/18 an der Modulation der Zellanhaftung und –spreizung, Zellgröße, Proteinsynthese und G1/S-Transition beteiligt (Galarneau L et al., 2007). In der Niere findet man die stärkste Expression im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife und im früh-distalen Tubulus (Baer PC et al., 2008). Hinsichtlich der Funktion im Podozyten ist nichts bekannt.

18. Mal2 = mal, T-cell differentiation protein 2:

Mal2 ist ein transmembranäres Protein mit vier membranüberspannenden Domänen und gehört zur MAC Proteolipid Familie. In polaren Zellen ist es überwiegend in endosomalen Strukturen unter der apikalen Membran lokalisiert und dient der Transzytose (Fanayan S et al., 2009) von Proteinen mit Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die apikale Oberfläche (de Marco MC et al., 2006). Die stärkste Expression des Gens findet sich in Niere, Lunge und Leber (Wilson SH et al., 2001).

19. Myh11 = myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle:

Dieses Myosin ist Bestandteil eines hexameren kontraktile Proteins, das aus zwei schweren Kettenuntereinheiten und zwei Paaren unterschiedlicher Leichtkettenuntereinheiten besteht. Die Funktion von Myh11 scheint jedoch nicht nur auf Kontraktilität beschränkt zu sein, denn Mutationen in seinem Gen tragen vermutlich zur Tumorentstehung bei. Als Mechanismen werden Störungen der Energiebalance oder Störungen von Differenzierungsentscheidungen in Progenitorzellen diskutiert (Alhopuro P et al., 2008).

20. Ptgfr = prostaglandin F receptor:

Ptgfr ist ein Mitglied der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, sein Ligand ist das Prostaglandin PGF2- α . Die Transkription von *Ptgfr* wird durch IL-1 β über einen Pfad stimuliert, der auch NF- κ B einbezieht (Zaragoza DB et al., 2006). Über die Wirkungsweise von Ptgfr ist im Wesentlichen bekannt, dass es zusammen mit PGF2- α im Uterus kurz vor der Geburt produziert wird und die proinflammatorische Aktivität von ebenfalls exprimierten Zytokinen unterstützt (Christiaens I et al., 2008). Seine Bedeutung im Podozyten ist noch unklar.

21. Ren1 = renin 1, structural:

Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen, stimuliert über die cAMP-Signalkaskade, produziert (Klar J et al., 2002). Die humane Isoform zeigt bei ihrer Reaktion mit Angiotensinogen im Rahmen der Blutdruckregulation eine pH-Abhängigkeit (Iwata H et al., 2007). Ob Renin auch eine Funktion speziell im Podozyten hat, ist unklar.

22. Scg5 = secretogranin V:

Secretogranin V gehört zur Graninfamilie, die vor allem in neuroendokrinen und Nervengewebe produziert werden und deren Serumkonzentration entsprechend bei neuroendokrinen Tumoren erhöht ist (Stridsberg M et al., 2008). Scg5 fungiert als spezifisches Chaperon für Proprotein-Konvertase 2 (PC-2) und ist wahrscheinlich beteiligt an der Bildung sekretorischer Granula und auch an der Regulation ihrer Sekretion (Mbikay M et al., 2001). Seine Funktion im Podozyten betreffend ist nichts bekannt.

23. Tagln = transgelin:

Transgelin ist ein Aktin-vernetzendes Protein in Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Bei Nierenerkrankungen wird die Expression von Tagln in den Podozyten gesteigert und scheint an den Veränderungen der Podozytenfortsätze im Rahmen der glomerulären Schädigung mitzuwirken (Miao J et al., 2009; Hauser PV et al., 2009).

24. Tmem30b = transmembrane protein 30B:

Tmem30b besitzt zwei transmembranäre Domänen und eine extrazelluläre Schleife und wird vorwiegend in den Inseln des Pankreas und der Niere gebildet. Vermutlich besteht seine Funktion in der Translokation von Phospholipiden (Katoh Y et al., 2004).

Ebenso wie bei den unter 3.5.1 beschriebenen Genen und den von ihnen kodierten Proteinen findet man auch hier ein relativ uneinheitliches Bild von Genen mit gesteigerter Expression nach Ausschaltung von *Lmx1b*. Während jedoch unter 3.5.1 zahlreiche Proteine mit Funktionen innerhalb des Immunsystems zu finden waren, ist diese Gruppe hier kaum vertreten. Stattdessen fällt die hohe Zahl an Molekülen für Zelladhäsion, -motilität und –kommunikation auf, woraus man schließen könnte, dass *Lmx1b* als Suppressor für deren

Gene wirkt. Um hier aber Aussagen mit größerer Sicherheit treffen zu können, sind sicher noch weitere Untersuchungen erforderlich.

4. Diskussion

4.1 Gesteigerte Empfindlichkeit konventioneller, nicht aber podozytenspezifischer *Lmx1b* Knock-out Mäuse gegen glomeruläre Schädigung mittels Anti-GBM Antikörpern

4.1.1 Vergleich des Anti-GBM-Serum Versuchs bei konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen verschiedener genetischer Hintergründe

Konventionelle *Lmx1b* Knock-out Mäuse waren das erste Tiermodell, das die humane Erkrankung des Nagel-Patella-Syndroms (NPS) widerspiegeln sollte, wobei das autosomal-dominant vererbte Leiden wahrscheinlich Folge einer Haploinsuffizienz für *LMX1B* ist (Dunston JA et al., 2004). Man musste jedoch feststellen, dass die Tiere, die für die Deletion der Exone 3 bis 7 von *Lmx1b* heterozygot waren, keinen auffälligen Phänotyp zeigten (Rohr C et al., 2002). In weiteren Versuchen konnte als erster Hinweis auf eventuell doch bestehende Unterschiede ein vermindertes kompensatorisches Wachstum der verbliebenen Niere nach Uninephrektomie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gezeigt werden (Endele S et al., 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wurden weitere Versuche unternommen, durch verschiedene nierenschädigende Verfahren, unter anderem die Injektion von Anti-GBM-Serum, Einblick in die Bedeutung der Inaktivierung eines Allels von *Lmx1b* bei Mäusen zu gewinnen.

Bei dem zuerst durchgeführten Versuch mit konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen auf BL/6-Hintergrund ergaben sich deutliche Hinweise auf eine erhöhte Empfindlichkeit der heterozygoten Tiere gegenüber jenen mit zwei Wildtyp-Allelen: während die Tiere mit zwei Wildtyp-Allelen nach Behandlung mit Anti-GBM-Serum in keinem Fall eine merkliche Proteinurie entwickelten, war dies bei einigen der heterozygoten Tiere in erheblichem Ausmaß der Fall (s. 3.1.1). Erstaunlich war allerdings die große Streubreite innerhalb dieser Gruppe (von keiner bis hin zu sehr starker Proteinurieentwicklung), obwohl der genetische Hintergrund bei Inzuchtstämmen nahezu identisch sein sollte. Als Erklärung könnte man Fehler im Versuchsablauf anführen. Zum einen kann die Resorption der zur Präimmunisierung (s. 2.2.4.A) subkutan injizierten Depots von Kaninchen-IgG mit komplettem Freund's Adjuvans durch etwas variierende Lokalisation und aus der Wunde heraustropfende Anteile ungleich gewesen sein und so Einfluss auf das Ausmaß der Immunantwort genommen haben. Wesentlich wahrscheinlicher sind jedoch Differenzen in

der Menge des intravasal verabreichten Anti-GBM-Serums, da die Injektion in die Gefäße hinter dem Augapfel sich öfters schwierig gestaltete. Ein anderer Erklärungsansatz wäre eine auch bei Inzuchtstämmen variierende epigenetische Komponente und die Mitwirkung anderer Transkriptionsfaktoren an der Ausbildung und dem Erhalt der Schlitzdiaphragmen zwischen den Podozytenfortsätzen und damit an der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere. Auch sie könnten Unterschiede in der Empfindlichkeit der einzelnen Maus gegenüber schädigenden Einflüssen bedingen. Ein für die Variabilität in der Ausprägung des Nierenschadens möglicherweise mitverantwortliches Protein ist *Ldb1*, das zwar kein Transkriptionsfaktor ist, aber die Funktion von *Lmx1b* vermutlich modifiziert (Suleiman H et al., 2007).

Neben diesem Protein gibt es zahlreiche Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Podozytenstruktur und –funktion, die durch Interaktion mit *LMX1B* oder auch unabhängig davon für die große Variabilität des Versuchsergebnisses, aber auch der Symptomatik des Nagel-Patella-Syndroms beim Menschen ursächlich sein könnten. In Frage käme etwa der Transkriptionsfaktor *LIM1*, der wie *LMX1B* zur Familie der Transkriptionsfaktoren mit LIM-Homeodomäne gehört und an der Nieren- und eventuell an der Podozytenentwicklung beteiligt ist (Kobayashi A et al., 2005). Wie *LMX1B* interagiert *LIM1* mit dem Kofaktor *LDB1* (Agulnick AD et al., 1996) und ist so eng mit der Funktion von *LMX1B* verknüpft. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, *PAX2*, tritt nachweislich mit *LMX1B* in Wechselwirkung, deren funktionelle Bedeutung bleibt noch unklar (Marini M et al., 2005). Darüber hinaus kann *PAX2* sowohl als Repressor als auch als Aktivator der Transkription von *WT1*, des Gens eines ebenfalls in der Niere bedeutsamen Transkriptionsfaktors, wirken (Dehbi M et al., 1996; Wagner KU et al., 1997). Das Fehlen von *WT1* führt zur Nierenagenesie (Kreidberg JA et al., 1993), außerdem bindet *WT1* die Promotorregion von *NPHS1* (Guo G et al., 2004; Wagner N et al., 2004), ohne dessen Genprodukt Nephin keine Schlitzdiaphragmen ausgebildet werden (Putala H et al., 2001; Rantanen M et al., 2002). In diesem Zusammenhang ebenfalls zu erwähnen wäre *Mafb*, das in den sich entwickelnden Podozyten exprimiert wird (Sadl VS et al., 2002) und dessen Inaktivierung zum Verlust der Podozytenfortsätze mit Herabregulierung von *Nphs1*, *Nphs2* und *Cd2ap* führt (Sadl VS et al., 2002; Moriguchi T et al., 2006). Eher von geringerem Interesse ist der Transkriptionsfaktor *FOXC2*, da er nach bisherigen Untersuchungen wahrscheinlich nur von *LMX1B* unabhängige Pfade reguliert

(Takemoto M et al., 2006). Mögliche andere, mit LMX1B interagierende Transkriptionsfaktoren sind die Hypoxia-Inducible-Factors mit den potentiellen Zielgenen für den vascular endothelial growth factor und den Chemokinrezeptor Cxcr4 im Podozyten (Freeburg PB et al., 2003; Ding M et al., 2006), außerdem das für die tubuläre und glomeruläre Differenzierung erforderliche POD1 (Quaggin SE et al., 1999), das vermutlich auch an der Regulation von *NPHS2* und *COL4A3* beteiligt ist (Cui S et al., 2005). Zu guter Letzt könnte man noch an die Retinsäurerezeptoren denken, denn All-trans Retinsäure induziert nachweislich die Podozytendifferenzierung, die Ausbildung der Fußfortsätze und die Aufregulation der Expression von *NPHS1* und *NPHS2* (Vaughan MR et al., 2005). Unabhängig von all diesen möglicherweise interferierenden Faktoren bleibt die Tatsache, dass die Mäuse mit zwei Wildtyp-Allelen im Versuch nie eine Proteinurie zeigten, so dass trotz der großen interindividuellen Unterschiede bei den heterozygoten Tieren das Fehlen eines Allels von *Lmx1b* vermutlich für die Entwicklung der Proteinurie verantwortlich war. Darauf deutet auch das Ergebnis der statistischen Auswertung hin, auch wenn es mit einem $p = 0,061$ nicht signifikant ist.

Schwierigkeiten bei der Erklärung bereitet der in der Folge identisch durchgeführte Versuchsablauf bei konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen auf JF1-Hintergrund. Bei Verwendung der gleichen Dosis an Anti-GBM-Serum wie bei den BL/6-Mäusen kam es bei allen Tieren zu einer starken Proteinurieentwicklung ohne erkennbare Unterschiede. Daraufhin wurde der Versuch mit 1:3 und 1:9 verdünntem Serum wiederholt, um bei geringeren Antikörperdosen eventuell Differenzen zu erkennen. Doch auch hier zeigte sich das gleiche Bild. Aus der Beobachtung, dass die mit der höchsten Verdünnungsstufe behandelten Mäuse elektronenmikroskopisch keinerlei Nierenschädigung aufwiesen, obwohl im Urin hohe Proteinkonzentrationen nachgewiesen wurden, muss man die Schlussfolgerung ziehen, dass bei diesen kleinen Mäusen die Urinsammlung in gewöhnlichen Stoffwechselkäfigen unzureichend ist. Bei den im Vergleich zu BL/6-Mäusen wesentlich kleineren JF1-Mäusen war es teilweise unmöglich, überhaupt Urin zu sammeln und wenn doch, dann waren es oft nur 1-2 µl, vor allem dann, wenn sich nach Injektion des Serums ihr Allgemeinzustand verschlechterte und zu noch geringeren Urinmengen führte. Die Beurteilung der Proteinkonzentration im Urin ist bei diesen Tieren also nur ein schlechtes Maß zur Abschätzung der tatsächlichen pathologischen Veränderungen in der Niere.

Auch bei den mit Serum einer mittleren Verdünnungsstufe (1:3) behandelten Tieren waren sowohl bei der Proteinkonzentration im Urin als auch im elektronenmikroskopischen Bild keine Unterschiede feststellbar. Bedenkt man aber die große Variationsbreite, die man bei den BL/6-Mäusen festgestellt hatte, so kann man eigentlich aufgrund von lediglich zwei Mäusen je Versuchsgruppe keine valide Aussage bezüglich bestehender oder nicht bestehender Differenzen treffen, weshalb es sinnvoll wäre, die Fallzahl deutlich zu erhöhen.

Insgesamt entsteht aus den Versuchen mit den BL/6-Mäusen der Eindruck, dass heterozygote *Lmx1b* knock-out Mäuse doch einen Phänotyp aufweisen, während die Befunde bei den Mäusen auf JF1-Hintergrund noch schwer zu deuten sind und weiterer Untersuchungen bedürfen.

4.1.2 Problematik der anderen nierenschädigenden Versuchsansätze bei konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen

Die Nierenschädigung zur Provokation eines Phänotyps bei konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen sollte nicht nur mit dem einen Ansatz der Injektion von Anti-GBM-Serum versucht werden. Als zwei andere Verfahren wurden die Injektion von Lipopolysaccharid (s. 2.2.4.B und 3.2) und die Implantation eines DOCA-Pellets und einer Angiotensin II-Pumpe nach Uninephrektomie (s. 2.2.4.C und 3.3) gewählt. Keines der beiden Verfahren führte zu einer merklichen Proteinurie bei den Versuchstieren. Im Falle des LPS-Versuchs erhebt sich die Frage, ob dieses Verfahren überhaupt zur Induktion einer Nierenschädigung wirksam ist, denn die vorbeschriebene Proteinurie bei Wildtyp-Mäusen nach Injektion von LPS (Wei C et al., 2008) liegt im Bereich von etwa 0,8 µg/µl, einem Wert, den wir auch bei unbehandelten Tieren häufig messen konnten. Damit war bei diesem Versuch mutmaßlich das ungeeignete Verfahren schuld daran, dass die Mäuse zwar zum Teil an dem induzierten, septischen Krankheitsbild verstarben, die Nieren aber zumindest weitgehend unbeeinträchtigt blieben.

Auch der Ansatz der hypertensiven glomerulären Schädigung mittels DOCA und Angiotensin II zeigte keine Wirkung auf die Proteinausscheidung der Mäuse, obwohl auch hier eine schwerwiegende Nierenschädigung beschrieben worden war (Kirchhoff F et al., 2008). Möglicherweise liegt hier die Erklärung in methodischen Problemen: das implantierte DOCA-

Pellet musste bei manchen Tieren mehrfach neu implantiert werden und bei der abschließenden Perfusion der Tiere war das Pellet kaum resorbiert. Der Grund für die mangelhafte Resorption trotz korrekter Implantation bleibt unklar.

In der Summe konnten diese beiden Versuche also wenig zur Untersuchung eines Nierenphänotyps bei konventionellen, heterozygoten *Lmx1b* Knock-out Mäusen beitragen.

4.1.3 Beobachtungen bei Mäusen mit konstitutiver podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b*

Bei diesem Tiermodell wird *Lmx1b* nur im Podozyten inaktiviert und ermöglicht so die Untersuchung der Bedeutung von *Lmx1b* ausschließlich in der Niere. Für diesen Defekt homozygote Tiere ähneln dem humanen NPS mehr als konventionelle *Lmx1b* Knock-out Mäuse (Suleiman H et al., 2007), doch auch hier zeigen die heterozygoten Tiere keinen Phänotyp. Deshalb sollte mittels Injektion von Anti-GBM-Serum (s. 2.2.4.A) versucht werden, analog zu dem Versuch mit den konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen, unterschiedliche Reaktionen im Vergleich zu den Tieren mit zwei Wildtyp-Allelen zu beobachten. Bei keiner der Mäuse der beiden Versuchsgruppen war jedoch eine Proteinurie zu beobachten. Da beim gleichen Versuch mit konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen, wenn auch mit großer Schwankungsbreite, eine teilweise sehr starke Proteinurieentwicklung zu beobachten war, muss man annehmen, dass in erster Linie die systemische, weniger die podozytenspezifische Wirkung von *Lmx1b* für die Ausbildung des Nierenversagens verantwortlich war. Primär wäre an eine Wirkung auf das Immunsystem zu denken, allerdings geht man heute davon aus, dass die Expression von *Lmx1b* postnatal weitgehend auf die Niere und das ZNS beschränkt ist (Dreyer SD et al., 1998; Smidt M et al., 2000), was natürlich einen lokalen Einfluss auf die Immunzellen in der Niere nicht ausschließt. Zusätzlich legen auch die Untersuchungen der mRNA aus Glomeruli von Mäusen mit induzierbarer podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* (s. 3.5) eine Bedeutung von *Lmx1b* in der Immunregulation nahe. Gewiss war die Anzahl der untersuchten Tiere für sichere Aussagen zu gering, dennoch könnten Untersuchungen in Hinblick auf Wirkungen von *Lmx1b* auf das Immunsystem zu vielversprechenden Ergebnissen führen.

4.2 Schlussfolgerungen aus den Überlebenskurven von Mäusen verschiedener Genotypen der Linie *Rb-lox3* (926) x *Lmx1b*^{2loxP} x P2.5-Cre

4.2.1 Hinweise auf eine wechselseitige Beeinflussung von *Lmx1b* und *Rb*

Über die Bedeutung von pRb in der Niere und speziell im Podozyten ist bisher noch wenig bekannt. Dennoch erscheint es durch seine Rolle in der Regulation des Zellzyklus, speziell des G1/S-Übergangs (Weinberg RA, 1995) und seiner Wirkung auf die Transkription bestimmter Gene (s. 1.3.2) ein geeigneter Kandidat für mögliche Wechselwirkungen mit dem Transkriptionsfaktor *Lmx1b*. Um derartige Wechselwirkungen zu erkennen, wurden die Überlebenskurven von Mäusen der Genotypen *Rb*^{+/-lox} *Lmx1b*^{+/-} Cre+, *Rb*^{+/-} *Lmx1b*^{+/-lox} Cre+ und *Rb*^{+/-lox} *Lmx1b*^{+/-lox} Cre+ verglichen. Während die Tiere der Genotypen *Rb*^{+/-lox} *Lmx1b*^{+/-} Cre+ und *Rb*^{+/-} *Lmx1b*^{+/-lox} Cre+ Überlebenskurven entsprechend denen der Tiere mit zwei Wildtyp-Allelen zeigten, war bei den Tieren des Genotyps *Rb*^{+/-lox} *Lmx1b*^{+/-lox} Cre+ ein deutlicher Abfall der Überlebenskurve zu erkennen (s. 3.4). Dies ist als starker Hinweis auf eine Interaktion von pRb und *Lmx1b* zu werten. Elektronenmikroskopisch fanden sich bei diesen Tieren Podozyten mit aufgelockerter Zytoplasmastruktur und filiformen Fortsätzen, die Podozytenfortsätze saßen der GBM teils breitbasig auf und an manchen Stellen war die glomeruläre Basalmembran gesplittet. Im subkapsulären Raum war ausgefallenes Protein zu sehen.

Angesichts dieser Befunde erhebt sich die Frage, auf welcher Ebene eine derartige Interaktion von *Lmx1b* und pRb stattfinden könnte. Die eine Möglichkeit wäre eine Beeinflussung auf der Ebene der Transkription. Eine Einflussnahme von *Lmx1b* auf die Transkription von *Rb* ist eher unwahrscheinlich, da die mRNA-Analysen aus Glomeruli induzierbarer podozytenspezifischer *Lmx1b* Knock-out Mäuse (s. 3.5) keine Veränderung der mRNA-Menge für *Rb* ergaben. Der umgekehrte Fall einer Einwirkung von pRb auf die Expression von *Lmx1b* über einen Transkriptionsfaktor der E2F-Familie dagegen erscheint durchaus möglich. Vor allem wenn man die Funktion von pRb bei der Differenzierung von Zellen des Nervensystems, der Muskulatur, des Fettgewebes und der Retina (Khidr L und Chen PL, 2006) bedenkt, wäre eine Beeinflussung der Differenzierung der Podozyten über *Lmx1b* vorstellbar. Hierfür spräche auch der elektronenmikroskopische Befund mit gestörter Ausbildung der Podozytenstruktur sowie der glomerulären Basalmembran, ein Befund, der

demjenigen in *Lmx1b*^{lox/lox} Cre+ Mäusen (Suleiman H et al., 2007), wenn auch in abgemilderter Form, ähnelt.

Eine andere Erklärungsvariante wäre eine Interaktion auf Ebene der Proteine pRb und Lmx1b, entweder direkt oder über einen ihrer Kofaktoren. Auch dieser Variante der wechselseitigen Beeinflussung ist gut vorstellbar, wenn nicht sogar von allen genannten Möglichkeiten die wahrscheinlichste. Welcher Art könnte diese Wechselwirkung sein? Ein direkter Kontakt der beiden Proteine Lmx1b und pRb ist eher unwahrscheinlich, da die Bindungspartner von pRb bereits gründlich erforscht sind: man kennt hier im Wesentlichen die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die an die große A/B-Tasche von pRb binden (Welch PJ und Wang JYJ, 1995; Hu Q et al., 1990; Kaelin WG et al., 1992) und die Tyrosinkinase c-Abl, die die C-Tasche bindet (Welch PJ und Wang JYJ, 1993). Andererseits bleibt trotzdem bis heute unklar, wie viele funktionelle Komplexe mit pRb eigentlich existieren und ob nicht möglicherweise ein pRb-Kernkomplex besteht, der sich zeitweilig mit anderen Proteinen verbindet, abhängig von spezifischen Wachstums- und Differenzierungsbedingungen (Khidr L und Chen PL, 2006). Einer dieser temporären Bindungspartner könnte auch Lmx1b sein.

Dennoch ist ein gemeinsamer Pfad von Lmx1b und pRb ohne direkte Interaktion wahrscheinlicher. Auch hier gibt es wieder mehrere verschiedene Möglichkeiten. Zum einen könnten die beiden Proteine Glieder in verschiedenen Pfaden sein, die auf eine gemeinsame Endstrecke konvergieren. Oder aber sie sind beide Glieder in einem Pfad, wobei dann wiederum Lmx1b im Ablauf vor oder nach pRb kommen könnte. Ersteres ist gut vorstellbar, da viele Pfade in der Regulation von Zellalterung und –differenzierung bei pRb zusammenlaufen (Zhang H, 2007), so dass Lmx1b durchaus Glied in einer dieser Ketten sein könnte, vor allem, da über diese Pfade bisher wenig bekannt ist. Aber auch ein Platz erst nach pRb ist möglich, denn pRb kann bestimmte, gewebespezifische Transkriptionsfaktoren aktivieren, unter anderem durch Aufhebung der Wirkung von Differenzierungsinhibitoren (Khidr L und Chen PL, 2006), warum sollte es nicht auch zu einer Aktivierung von Lmx1b führen? Welche all dieser Varianten aber letztlich die zutreffende ist, werden weitere Untersuchungen klären müssen.

4.2.2 Bedeutung der Insertion von *loxP*-Stellen

Neben dem unter 4.2.1 erörterten Hauptbefund fanden sich erstaunlicherweise auch rapide abfallende Überlebenskurven für die Mäuse des Genotyps $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre-$, die annähernd dem Verlauf der Überlebenskurven von $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ Mäusen glichen. Zusätzlich mussten wir feststellen, dass das elektronenmikroskopische Bild einer Niere einer $Rb^{lox/lox} Lmx1b^{lox/lox} Cre-$ Maus, die wegen ihres schlechten Allgemeinzustands interessehalber perfundiert worden war, dem oben für die $Rb^{+/lox} Lmx1b^{+/lox} Cre+$ Tiere beschriebenen Bild glich. Auch bei diesem Tier war die Zytoplasmastruktur der Podozytenfortsätze teilweise aufgelockert und die Fortsätze saßen der GBM an manchen Stellen breitbasig auf. Auch Stellen mit gesplitteter GBM waren zu erkennen. In Abwesenheit von Cre-Rekombinase erfolgt aber keine Rekombination zwischen den beiden *loxP*-Stellen. Hat also das Einfügen von *loxP*-Stellen allein bereits einen negativen Effekt auf die Funktion oder Transkription der Gene? Dies würde allerdings im Widerspruch zu früheren Beobachtungen stehen, wonach Mäuse nur mit geflochten Allelen für *Lmx1b* keinen Phänotyp zeigen und eine normale Lebenserwartung haben (Suleiman H et al., 2007). Diese Beobachtungen gelten nur für das geflochte Allel für *Lmx1b*, nicht aber für das von *Rb*. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Expression von *Rb* durch die *loxP*-Stellen doch beeinflusst wird und letztlich, falls tatsächlich ein Zusammenhang zwischen *Rb* und *Lmx1b* besteht, einen negativen Effekt auf die Expression oder Funktion von *Lmx1b* bzw. seines Genproduktes hat. Auch für die Auflösung dieses Problems werden weitere Versuche erforderlich sein, zumal da die Tiere mit diesen Auffälligkeiten nur am Rande beobachtet wurden und deshalb nicht sehr zahlreich waren.

4.3 Potentielle Zielgene von *Lmx1b*

4.3.1 Zielgene aus dem Bereich des Immunsystems

Über die durch den Transkriptionsfaktor *Lmx1b* regulierten Gene ist noch wenig bekannt. Durch Analyse der mRNA-Spiegels in den Glomeruli nach Induktion von Mäusen mit induzierbarer podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b* sollten potentielle Zielgene von *Lmx1b* identifiziert werden.

Dabei fand sich eine auffällige Zahl von Genen, deren Produkte Funktionen im Immunsystem wahrnehmen (s. 3.5), wobei die meisten dieser Proteine nach Inaktivierung von *Lmx1b* vermindert gebildet werden. Für einige von ihnen ist ihre Bedeutung zumindest bei anderen Nierenerkrankungen als dem NPS bereits erwiesen. Dazu gehören die Toll-like Rezeptoren, die eine wesentliche Rolle bei Immunkomplexkrankheiten wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen spielen. TLR1 bis TLR6 werde auf Nierenzellen exprimiert und TLR7 und TLR9 wirken in der Pathogenese der Lupus-Nephritis mit (Anders HJ und Schlöndorff D, 2007). Die Lupus-Nephritis ist gerade in Hinblick auf den Versuch der Injektion von Anti-GBM-Serum (s. 4.1.1) überhaupt ein interessantes Krankheitsbild, denn auch sie wird durch in der Niere abgelagerte Antikörper verursacht. Des Weiteren sind die Invasion von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen sowie die Produktion von Interferonen für das Fortschreiten der Erkrankung entscheidend (Bagavant H und Fu SM, 2009). Interessanterweise scheint *Lmx1b* an der Regulation des interferon activated gene 202B (lupus susceptibility factor) beteiligt zu sein, sodass man annehmen könnte, dass die Pfade bei der Nierenschädigung durch Injektion von Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran bei *Lmx1b* Knock-out Mäusen und diejenigen bei der Lupus-Nephritis sich ähneln oder sogar teilweise überschneiden.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die wahrscheinliche Beteiligung von *Lmx1b* an der Regulation der Bildung von Renin, da inzwischen bekannt ist, dass das Renin-Angiotensin-System sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität beeinflusst und über die TGF β - und Smad-Pfade zur Fibrosierung führt. Ferner steigert das Renin-Angiotensin-System die Aktivität von T-Zellen und einige seiner Komponenten wirken chemotaktisch auf Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen (Geara AS et al., 2009). Das RAS wird durch Antikörperablagerung an der glomerulären Basalmembran aktiviert (Hisada Y et al., 1999; Boyce NW et al., 1987). Insoweit würde eine Beteiligung von *Lmx1b* an der Regulation der Bildung von Renin gut in das Konzept passen, allerdings wird Renin nicht in Podozyten, sondern in Myoepithelzellen der Vasa afferentia des Nierenkörperchens gebildet. Eine direkte Regulation der Reninbildung ist somit nicht möglich. Bedenkt man aber das Isolationsverfahren von Glomeruli (s. 2.2.3), so ist es gut möglich, dass nicht nur die mRNA der Podozyten, sondern auch die von Endothelzellen und Myoepithelzellen mitisoliert und – analysiert wurde. Damit könnte die gesteigerte Expression des Gens für Renin indirekte

Folge der Inaktivierung von *Lmx1b* im Podozyten und der daraus resultierenden Veränderungen von Zellstruktur, -funktion und -kommunikation sein.

Auch Hitzeschockproteine (Anders HJ und Schlöndorff D, 2007) und Fc-Rezeptoren (Suzuki Y et al., 1998) sind an der Entwicklung und dem Fortschreiten von Nierenerkrankungen beteiligt. *Lmx1b* scheint auch an ihrer Regulation mitzuwirken.

Insgesamt findet sich eine Fülle von Systemen, die bei der immunologischen Schädigung der Nieren eingreifen und innerhalb derer *Lmx1b* möglicherweise seinen Platz hat, der aber noch einer genaueren Definition bedarf.

4.3.2 Zielgene aus dem Bereich der Zelladhäsion und -motilität

Neben den Genen, deren Produkte ihren Platz in der Immunregulation haben (s. 4.3.1), fand sich auch eine beachtliche Zahl solcher, deren Produkte wichtig für die Zelladhäsion, Zellmotilität und -kommunikation sind, wie zum Beispiel Cadherin-1, Claudin-11, Claudin-8, Desmoglein-2, Desmoplakin, Gap junction protein α 1 und Kinesin family member 21A (s. 3.5). Sie wurden nach Inaktivierung von *Lmx1b* fast ausnahmslos gesteigert gebildet, sodass die Vermutung nahe liegt, dass *Lmx1b* normalerweise als Suppressor ihrer Gene wirkt. Ein Zusammenhang mit der Symptomatik des Nagel-Patella-Syndroms ist leicht vorstellbar, denn Defekte in der interzellulären Kommunikation führen auch zu zahlreichen anderen Erkrankungen wie Neuropathien, Infertilität, Autoimmunerkrankungen und Krebs (Trosko JE et al., 1998). Als bei solchen Krankheitsbildern bedeutsame Moleküle wären zum Beispiel die Integrine, eine große Familie von an der Zelloberfläche lokalisierten Proteinen, zu nennen. Sie binden extrazelluläre Matrixmoleküle und aktivieren daraufhin intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden. Aber auch die Tight junctions, die Desmosomen, die Zonulae adhaerentes und die Gap junctions dienen nicht allein der Zellverbindung, sondern zusätzlich der Signalübertragung (Ruch RJ, 2002). Insbesondere die Kommunikation über Gap junctions ist essentiell für die Synchronisation zellulärer Aktivitäten, für die Homöostase und die Regulation von Proliferation und Apoptose (Ruch RJ, 2000). Wieder andere Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und die Selektine sind für die Rekrutierung von Leukozyten und andere entzündliche Reaktionen im Rahmen einer Nierenschädigung erforderlich

(Prozialeck WC und Edwards JR, 2007). Doch auch hier ergibt sich analog wie oben bei dem Renin-Angiotensin System das Problem, dass in Podozyten keine Gap junctions und Desmosomen nachgewiesen sind. Als wahrscheinlichste Erklärung ist wiederum anzuführen, dass die Steigerung der Expression dieser Gene nicht im Podozyten selbst stattgefunden hat, sondern eine Reaktion zum Beispiel der Endothelzellen auf die Inaktivierung von *Lmx1b* im Podozyten war.

Schließlich solle man auch den strukturellen Stellenwert der Adhäsionsmoleküle nicht vergessen. Proteine wie die Cadherine, die Catenine, ZO-1, Okkludin und die Claudine sind unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität (Prozialeck WC und Edwards JR, 2007), andere wie die mit Adhäsionskomplexen assoziierten Moleküle Paxillin, Nephrin, Talin und Vinculin sind mitverantwortlich für die Integrität der glomerulären Ultrafiltration (Zhang Y et al., 2010). Und auch die Intaktheit von Struktur und Funktion der Podozytenfortsätze wird zwar zum einen durch Interaktionen von Nephrin mit Proteinen des Schlitzdiaphragmas und die Regulation des Aktin-Zytoskeletts über Rho-GTPasen erhalten, zum anderen aber zusätzlich durch die von den Zelladhäsionskomplexen ausgelösten Signaltransduktionskaskaden gewährleistet (Chuang PY und He JC, 2009).

Angesichts dieser Erkenntnisse in Verbindung mit den beobachtbaren glomerulären Veränderungen bei Inaktivierung von *Lmx1b* erscheint eine Beteiligung von *Lmx1b* an der Regulation der Zelladhäsion und –kommunikation durchaus plausibel und ist sicherlich einer intensiveren Erforschung würdig.

4.3.3 Bedeutung von Microarrays

Für die Analyse der Genexpression nach Inaktivierung von *Lmx1b* im Podozyten wurde ein Microarray der Firma Affymetrix verwendet. Dieses Analyseverfahren ist heute in weiten Bereichen von Klinik und Forschung sehr beliebt, da es die Analyse von Genexpressionsmustern im Laufe der Zeit ermöglicht. Zusätzlich erfordert es keine DNA-Sequenzierung und Tausende Gene verschiedener Proben können parallel untersucht werden (Mocellin S und Rossi CR, 2007). Microarrays spielen auch eine wachsende Rolle in der Diagnose von Krankheiten: sie ermöglichen die Identifizierung krankheitsrelevanter

Gene, die Analyse posttranslationaler Modifikationen und das Screening auf relevante SNPs (single nucleotide polymorphisms). Auch genetische Störungen können durch Untersuchungen auf chromosomale Aberrationen, durch Mutationsanalyse und durch Detektion relevanter SNPs diagnostiziert werden. Zusätzlich ist der Nachweis von Infektionskrankheiten durch Bakterien, Viren und Pilze mittels Microarray möglich (Yoo SM et al., 2009).

Und nicht zuletzt liegt ein großer Wert von Arrays in den Möglichkeiten der Analyse veränderter Genexpressionsprofile nach Inaktivierung eines Gens, in dieser Arbeit nach Inaktivierung von *Lmx1b*. Analysiert wurde die RNA aus Glomeruli nach Inaktivierung von *Lmx1b* im Podozyten. Der große Vorteil dieses Analyseverfahrens lag zweifellos in dem immensen Datensatz, der die Entdeckung potentieller Zielgene von *Lmx1b* ermöglichte, an die ansonsten vermutlich niemand gedacht hätte. Gleichzeitig erhebt sich mit der großen Datenmenge aber auch die Frage nach der Relevanz einer gesteigerten oder verminderten Genexpression, vor allem, wenn das Genprodukt wie zum Beispiel Renin oder desmosomale Proteine gar nicht im Podozyten produziert werden. Für derartige Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungen: zum einen sind die Ergebnisse aufgrund der geringen Probenzahl (nur 5 Tiere) nicht absolut zuverlässig. Zusätzlich hängt die Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten natürlich von der Qualität der isolierten RNA ab, die vermutlich gewissen Schwankungen unterliegt. Andererseits muss man bedenken, dass in diesem Versuch Glomeruli isoliert worden waren, und nicht Podozyten. Folglich war auch RNA aus Endothel- und Mesangiumzellen, zum geringen Teil eventuell auch aus Tubuluszellen in der analysierten Probe. Veränderungen der Genexpression müssen also nicht nur direkte Folge der Inaktivierung von *Lmx1b* im Podozyten gewesen sein, sondern auch sekundäre Veränderungen in benachbarten Zellen als Reaktion auf die Podozytenschädigung sind möglich. Eine Differenzierung zwischen direkten und indirekten Folgen der Inaktivierung von *Lmx1b* ist also nicht möglich. Auf der anderen Hand werden Sekundäreffekte auf weiter entfernte Strukturen, etwa den Tubulusapparat, nicht erfasst. Somit ermöglicht auch der Microarray keine umfassende Analyse aller durch Inaktivierung eines Gens ausgelöster Veränderungen, dennoch ist er für die Identifizierung potentiell interessanter Zielgene des inaktivierten Gens äußerst wertvoll.

5. Zusammenfassung

Das Nagel-Patella Syndrom (NPS) zeigt eine Inzidenz von etwa 1:50.000 und ist durch Nagel-, Knie-, Ellbogen- und Hüftfehlbildungen sowie durch eine Nieren- und Augenbeteiligung gekennzeichnet (Sweeney E et al., 2003). Prognostisch entscheidend für die Patienten ist jedoch das Ausmaß der Nierenbeteiligung. Als für die Erkrankung verantwortliches Gen wurde *LMX1B*, das auf Chromosom 9q34 lokalisiert ist, identifiziert (McIntosh I et al., 1997). Seitdem wurden verschiedene Tiermodelle zur Verbesserung des Verständnisses der Pathogenese des NPS entwickelt. Ziel dieser Arbeit war es, diese verschiedenen Mausmodelle noch besser zu charakterisieren.

Zum einen wären da die konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäuse, bei denen die homozygoten Tiere zwar eine Symptomatik ähnlich dem NPS zeigen (Chen H et al., 1998), die heterozygoten Tiere aber keinen auffälligen Phänotyp aufweisen (Rohr C et al., 2002). Hier konnte im Rahmen der Arbeit eine größere Neigung zur Entwicklung einer Proteinurie bei *Lmx1b*^{+/-} Tieren im Gegensatz zu *Lmx1b*^{+/+} Tieren nach Injektion von Anti-GBM-Serum festgestellt werden, so dass die heterozygoten Tiere möglicherweise doch einen Phänotyp in Form einer höheren Anfälligkeit gegenüber nierenschädigenden Einflüssen zeigen. Andere Ansätze der Nierenschädigung verliefen dagegen enttäuschend und konnten kein unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Genotypen aufdecken.

Weiterhin charakterisiert werden sollten Mäuse mit konstitutiver podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b*. Im Gegensatz zu den konventionellen *Lmx1b* Knock-out Mäusen zeigten sie keine auffällige Reaktion auf die Injektion von Anti-GBM-Serum, woraus man auf eine systemische Wirkung von *Lmx1b* als Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit der konventionellen Knock-out Tiere schließen könnte.

Ein anderer Ansatz zum besseren Verständnis der Funktion von *Lmx1b* war die Analyse von mRNA aus Glomeruli von Mäusen mit induzierbarer, podozytenspezifischer Inaktivierung von *Lmx1b*. Sie ergab Hinweise auf eine wichtige Rolle von *Lmx1b* in der Regulation von Genen, deren Produkte von Bedeutung für das Immunsystem und für die Zelladhäsion, -motilität und -kommunikation sind.

Zuletzt wurde noch mittels Überlebenskurven für Mäuse verschiedener Genotypen der Linie *Rb-lox3* (926) x *Lmx1b*^{2loxP} x P2.5-Cre eine mögliche Wechselwirkung von pRb und Lmx1b untersucht. Durch das im Vergleich mit den anderen relevanten Gruppen deutlich schlechtere Überleben von *Rb*^{+lox} *Lmx1b*^{+lox} Cre+ Tieren muss tatsächlich eine Interaktion der beiden Proteine vermutet werden, deren Ausmaß und funktionelle Bedeutung jedoch noch zu ergründen bleibt.

6. Abkürzungsverzeichnis**6.1 Chemische Symbole**

B	Bor
Ca	Calcium
Cl	Chlor
H	Wasserstoff
K	Kalium
Mg	Magnesium
N	Stickstoff
Na	Natrium
O	Sauerstoff
P	Phosphor
S	Schwefel

6.2 Länderabkürzungen

AU	Österreich
B	Belgien
CA	Kanada
CH	Schweiz
D	Deutschland
F	Frankreich
GB	Großbritannien

N	Norwegen
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
6.3 <u>Andere</u>	
%	Prozent
A_{590}/A_{450}	Absorption bei 590 nm / 450 nm
Abb.	Abbildung
Adam10	a disintegrin and metallopeptidase domain 10
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqp	Aquaporin
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
c-Abl	Abl Tyrosinkinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Car	Carboanhydrase
Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CD/Cd	cluster of differentiation
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein

Cdh	Cadherin
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
Cdo	Cystindioxygenase
Cldn	Claudin
Clec4a3	C-type lectin domain family 4 member a3
cm	Zentimeter
COL4A3	Kollagen, Typ IV, alpha 3
Coro1a	coronin, actin binding protein 1A
Cre	Cyclization recombination
CRP	C-reaktives Protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cxcl10/2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10/ligand2
Cxcr	chemokine (C-X-C motif) receptor
d	Tag
D	Decrease
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

DOCA	Deoxycorticosteronacetat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
Dsg	Desmoglein
Dsp	Desmoplakin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E2A	Immunoglobulin enhancer-binding factor E12/E47 gene
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
Edg8	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein coupled receptor 8
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
<i>En1</i>	Engrailed 1
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
et al.	und andere
F-Aktin	filamentäres Aktin
FAT1	FAT tumor suppressor homolog 1
Fcgr1/3/4	Fc receptor, IgG I/III/IV
Fgfr	Fibroblast growth factor receptor
Fgl	Fibrinogen-like protein
Fkbp5	FK506 binding protein 5
<i>FOXC2</i>	forkhead box C2 Gen

g	Gramm
G	Gauge (steht für den Außendurchmesser von Kanülen)
GA	Glutaraldehyd
GBM	Glomeruläre Basalmembran
Gimap5	GTPase, IMAP family member 5
Gja1	gap junction protein, alpha 1
Gldc	Glycinecarboxylase
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hrsg.	Herausgeber
Hsp	Hitzeschockprotein
HSV-1	Humanes Herpesvirus-1
I	Increase
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül- 1
IE	Internationale Einheit
Ifi202b	Interferon activated gene 202B
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

Irg1	Immunoresponsive gene 1
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kif21a	Kinesin family member 21A
ko	knock-out
Krt	Keratin
kum.	kumulativ
l	Liter
LDB	LIM-domain binding protein
LIM-Domäne	Lin-11, Is1-1, Mec-3 Domäne
<i>LIM1</i>	LIM Homeobox Gen 1
LMX1B	LIM Homeobox Transkriptionsfaktor β
<i>loxP</i>	Locus of x-over of P1
LPS	Lipopolysaccharid
<i>NPHS1</i>	Gen für Nephrin
<i>NPHS2</i>	Gen für Podocin
M	molar
<i>MafB</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
Mal2	Mal, T-cell differentiation protein

MD	Minimal decrease
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MI	Minimal increase
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
Mmp	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger RNA
Myh11	Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle
Myo1f	Myosin IF
n	Anzahl
NC	No change
NFκB	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
NPS	Nagel-Patella Syndrom

Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminoterminus
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p	Wahrscheinlichkeit
p107	retinoblastoma-like 1
p130	retinoblastoma-like 2
p. a.	pro analysi
PAS	Perjodschiffsäure
PAX	Paired-box Gen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pc	post conceptionem
PC-2	Proprotein-Konvertase 2
Pcdhb4	Protocadherin beta 4
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGF2- α	Prostaglandin F2- α
Pilra	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
Ppbp	Pro-platelet basic protein
pRB	Retinoblastom (Protein)
Ptgfr	Prostaglandin F Rezeptor
RAS	Renin-Angiotensin System

Rb	Retinoblastom (Gen)
Ren	Renin
Rgs	Regulator of G-protein signaling
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rtTA	reverse tetracycline-controlled transcriptional activator
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
Scg	Secretogranin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat- Puffer
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TagIn	Transgelin
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
tetO	Tet operator sequence

TLR	Toll-like receptor
Tmem30b	Transmembranäres Protein 30B
TNF	Tumornekrosefaktor
Treml4	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4
Tris	Tris (hydroxymethyl) - aminomethan
tTA	tetracycline-controlled transcriptional activator
Tyrobp	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
U	Unit
Univ.	Universität
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs	versus
<i>Wnt7a</i>	wingless-related MMTV integration site 7A
WT-1	Wilms-Tumor 1
w/v	weight/volume
x	Mal
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

ZO-1

Zonula occludens-1

7. Literaturverzeichnis

- Agulnick A. D., Taira M., Breen J. J., Tanaka T., Dawid I. B., Westphal H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature*. **384**, 270-272.
- Alhopuro P., Phichith D., Tuupanen S., Sammalkorpi H., Nybondas M., Saharinen J., Robinson J. P., Yang Z., Chen L. Q., Orntoft T., Mecklin J. P., Järvinen H., Eng C., Moeslein G., Shibata D., Houlston R. S., Lucassen A., Tomlinson I. P., Launonen V., Ristimäki A., Arango D., Karhu A., Sweeney H. L., Aaltonen L. A. (2008). Unregulated smooth-muscle myosin in human intestinal neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**, 5513-5518.
- Altvater B., Landmeier S., Pscherer S., Temme J., Juergens H., Pule M., Rossig C. (2009). 2B4 (CD244) signaling via chimeric receptors costimulates tumor-antigen specific proliferation and in vitro expansion of human T cells. *Cancer Immunol Immunother*. **58 (12)**, 1991-2001.
- Anders H. J., Schlöndorff D. (2007). Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **16**, 177-183.
- Andreadis D., Nomikos A., Barbatis C. (2007). Metastatic renal clear cell carcinoma in the parotid gland: a study of immunohistochemical profile and cell adhesion molecules (CAMs) expression in two cases. *Pathol Oncol Res*. **13**, 161-165.
- Arii J., Uema M., Morimoto T., Sagara H., Akashi H., Ono E., Arase H., Kawaguchi Y. (2009). Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha. *J Virol*. **83**, 4520-4527.
- Bach I., Carrière C., Ostendorff H. P., Andersen B., Rosenfeld M. G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev*. **11**, 1370-1380.
- Baer P. C., Geiger H. (2008). Human renal cells form the thick ascending limb and early distal tubule: characterization of primary isolated and cultured cells by reverse transcription polymerase chain reaction. *Nephrology (Carlton)*. **13**, 316-321.
- Bagavant H., Fu S. M. (2009). Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematoses. *Curr Opin Rheumatol*. **21**, 489-494.
- Balda M. S., Matter K. (2000). Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin Cell Dev Biol*. **11**, 281-299.
- Bantis C., Heering P. J., Aker S., Schwandt C., Grabensee B., Ivens K. (2008). Influence of interleukin-10 gene G-1082A polymorphism on recurrent IgA nephropathy. *J Nephrol*. **21**, 941-946.
- Barletta G. M., Kovari I. A., Verma R. K., Kerjaschki D., Holzman L. B. (2003). Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis heterooligomers. *J Biol Chem*. **278**, 19266-19271.

- Baron U., Freundlieb S., Gossen M., Bujard H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3605-3606.
- Baudino L., Nimmerjahn F., Azeredo da Silveira S., Martinez-Soria E., Saito T., Carroll M., Ravetch J. V., Verbeek J. S., Izui S. (2008). Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice. *J Immunol.* **180**, 1948-1953.
- Bauer J. W., Petri M., Batliwalla F. M., Koeuth T., Wilson J., Slattey C., Panoskaltsis-Mortari A., Gregersen P. K., Behrens T. W., Baechler E. C. (2009). Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis Rheum.* **60**, 3098-3107.
- Beals R. K., Eckhardt A. L. (1969). Hereditary onycho-osteodysplasia (nail-patella syndrome). A report of nine kindreds. *J Bone Joint Surg Am.* **51**, 505-516.
- Bennett W. M., Musgrave J. E., Campbell R. A., Elliot D., Cox R., Brooks R. E., Lovrien E. W., Beals R. K., Porter G. A. (1973). The nephropathy of the nail-patella syndrome. Clinicopathologic analysis of 11 kindred. *Am J Med.* **54**, 304-319.
- Binder E. B. (2009). The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology.* **34**, 186-195.
- Bongers E. M., Gubler M. C., Knoers N. V. (2002). Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings. *Pediatr Nephrol.* **17**, 703-712.
- Bongers E. M. H. F., Huysmans F. T., Levtchenko E., de Rooy J. W., Blickman J. G., Admiraal R. J. C., Huygen P. L. M., Cruysberg J. R. M., Toolens P. A. M. P., Prins J. B., Krabbe P. F. M., Borm G. F., Schoots J., van Bokhoven H., van Remortele A. M. F., Hoefsloot L. H., van Kampen A., Knoers N. V. A. M. (2005). Genotype-phenotype studies in nail-patella syndrome show that *LMX1B* mutation location is involved in the risk of developing nephropathy. *Eur J Hum Genet.* **13**, 935-946.
- Boone M., Deen P. M. (2008). Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch.* **456**, 1005-1024.
- Boute N., Gribouval O., Roselli S., Benessy F., Lee H., Fuchshuber A., Dahan K., Gubler M. C., Niaudet P., Antignac C. (2000). *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* **24**, 349-354.
- Boyce N. W., Holdsworth S. R. (1987). Intrarenal hemodynamic alterations induced by anti-GBM antibody. *Kidney Int.* **31**, 8-14.
- Brennan D., Mahoney M. G. (2009). Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas: A tissue-microarray based study. *Cell Adh Migr.* **3**, 148-154.

- Brown H. J., Lock H. R., Wolfs T. G., Buurman W. A., Sacks S. H., Robson M. G. (2007). Toll-like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody-mediated glomerulonephritis via CXCL1 and CXCL2. *J Am Soc Nephrol.* **18**, 1732-1739.
- Cam H., Dynlacht B. D. (2003). Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell.* **3**, 311-316.
- Carbonara P., Alpert M. (1964). Hereditary osteo-onycho-dysplasia (HOOD). *Am J Med Sci.* **248**, 139-151.
- Chen H., Lun Y., Ovchinnikov D., Kokubo H., Oberg K. C., Pepicelli C. V., Gan L., Lee B., Johnson R. L. (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome. *Nat Genet.* **19**, 51-55.
- Chen H., Ovchinnikov D., Pressman CL, Aulehla A, Lun Y, Johnson RL. (1998). Multiple calvarial defects in *Lmx1b* mutant mice. *Dev Genet.* **22**, 314-320.
- Chen J., Panchanathan R., Choubey D. (2008). Stimulation of T cells up-regulates expression of Ifi202, an interferon-inducible lupus susceptibility gene, through activation of JNK/c-Jun pathway. *Immunol Lett.* **118**, 13-20.
- Choubey D., Panchanathan R. (2008). Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett.* **119**, 32-41.
- Christiaens I., Zaragoza D. B., Guilbert L., Robertson S. A., Mitchell B. F., Olson D. M. (2008). Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol.* **79**, 50-57.
- Chuang P. Y., He J. C. (2009). Signaling in regulation of podocyte phenotypes. *Nephron Physiol.* **111**, 9-15.
- Ciani L., Patel A., Allen N. D., French-Constant C. (2003). Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol.* **23**, 3575-3582.
- Clarke A. R., Maandag E. R., van Roon M., van der Lugt N. M., van der Valk M., Hooper M. L., Berns A., and te Riele H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature.* **359**, 328-330.
- Clough M. V., Hamlington J. D., McIntosh I. (1999). Restricted distribution of loss-of-function mutations within the *LMX1B* gene of nail patella syndrome patients. *Hum Mutat.* **14**, 459-465.
- Cui S., Li C., Ema M., Weinstein J., Quaggin S. E. (2005). Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in *Pod1* knockout mice. *J Am Soc Nephrol.* **16**, 3247-3255.

- Curtiss J., Heilig J. S. (1998). DeLIMiting development. *Bioassays*. **20**, 58-69.
- Cygan J., Johnson R., McMahon A. (1997). Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in *Wnt-7a* and *En-1* mutants. *Development*. **124**, 5021-5032.
- Datta D., Dormond O., Basu A., Briscoe D. M., Pal S. (2007). Heme oxygenase-1 modulates the expression of the anti-angiogenic chemokine CXCL-10 in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. **293**, 1222-1230.
- Dawid I. B., Toyama R., Taira M. (1995). LIM domain proteins. *C R Acad Sci III*. **318**, 295-306.
- De Marco M. C., Puertollano R., Martínez-Menárguez J. A., Alonso M. A. (2006). Dynamics of MAL2 during glycosylphosphatidylinositol-anchored protein transcytotic transport to the apical surface of hepatoma HepG2 cells. *Traffic*. **7**, 61-73.
- De Vuyst E., Wang N., Decrock E., De Bock M., Vinken M., Van Moorhem M., Lai C., Culot M., Rogiers V., Cecchelli R., Naus C. C., Evans W. H., Leybaert L. (2009). Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium*. **46**, 176-187.
- Degrandi D., Hoffmann R., Beuter-Gunia C., Pfeffer K. (2009). The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J Interferon Cytokine Res*. **29**, 55-67.
- Dehbi M., Ghahremani M., Lechner M., Dressler G., Pelletier J. (1996). The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene*. **13**, 447-453.
- Demer J. L., Clark R. A., Engle E. C. (2005). Magnetic resonance imaging evidence for widespread orbital dysinnervation in congenital fibrosis of extraocular muscles due to mutations in KIF21A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **46**, 530-539.
- Ding M., Cui S., Li C., Jothy S., Haase V., Steer B. M., Marsden P. A., Pippin J., Shankland S., Rastaldi M. P., Cohen C. D., Kretzler M., Quaggin S. E. (2006). Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med*. **12**, 1081-1087.
- Ding Y. Q., Marklund U., Yuan W., Yin J., Wegman L., Ericson J., Deneris E., Johnson R. L., Chen Z. F. (2003). Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat Neurosci*. **6**, 933-938.
- Dittmer A., Hohlfield K., Lützkendorf J., Müller L. P., Dittmer J. (2009). Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell Mol Life Sci*. **66**, 3053-3065.
- Dreyer S. D., Morello R., German M. S., Zabel B., Winterpacht A., Lunstrum G. P., Horton W. A., Oberg K. C., Lee B. (2000). *LMX1B* transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet*. **9**, 1067-1074.

- Dreyer S. D., Zhou G., Baldini A., Winterpacht A., Zabel B., Cole W., Johnson R. L., Lee B. (1998). Mutations in *LMX1B* cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet.* **19**, 47-50.
- Dunston J. A., Hamlington J. D., Zaveri J., Sweeney E., Sibbring J., Tran C., Malbroux M., O'Neill J. P., Mountford R., McIntosh I. (2004). The human LMX1B gene: transcription unit, promoter, and pathogenic mutations. *Genomics.* **84**, 565-576.
- Dyson N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262.
- Eberle F., Sirin M., Binder M., Dalpke A. H. (2009). Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *Eur J Immunol.* **39**, 2537-2547.
- Edgerton K. L., Kausman J. Y., Li M., O'Sullivan K., Lo C., Hutchinson P., Yagita H., Holdsworth S. R., Kitching A. R. (2008). Intrarenal antigens activate CD4+ cells via co-stimulatory signals from dendritic cells. *J Am Soc Nephrol.* **19**, 515-526.
- Elkouby-Naor L., Abassi Z., Lagziel A., Gow A., Ben-Yosef T. (2008). Double gene deletion reveals lack of cooperation between claudin 11 and claudin 14 tight junction proteins. *Cell Tissue Res.* **333**, 427-438.
- Endele S., Klein S., Richter S., Molter T., Amann K., Klanke B., Witzgall R., Johnson R. L., Hilgers K. F., Winterpacht A. (2007). Renal phenotype in heterozygous *Lmx1b* knockout mice (*Lmx1b*^{+/-}) after unilateral nephrectomy. *Transgenic Res.* **16**, 723-729.
- Fanayan S., Shehata M., Agterof A. P., McGuckin M. A., Alonso M. A., Byrne J. A. (2009). Mucin 1 (MC1) is a novel partner for MAL2 in breast carcinoma cells. *BMC Cell Biol.* **10**, 7.
- Ferguson K. L., McClellan K. A., Vanderluit J. L., McIntosh W. C., Schuurmans C., Polleux F., Slack R. S. (2005). A cell-autonomous requirement for the cell cycle regulatory protein, Rb, in neuronal migration. *EMBO J.* **24**, 4381-4391.
- Flint J., Shenk T. (1997). Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet.* **31**, 177-212.
- Ford M. D., Cauchi J., Greferath U., Bertram J. F. (1997). Expression of fibroblast growth factors and their receptors in rat glomeruli. *Kidney Int.* **51**, 1729-1738.
- Freeburg P. B., Robert B., St. John P. L., Abrahamson D. R. (2003). Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development. *J Am Soc Nephrol.* **14**, 927-938.
- Fujii T., Hamano Y., Ueda S., Akikusa B., Yamasaki S., Ogawa M., Saisho H., Verbeek J. S., Taki S., Saito T. (2003). Predominant role of FcγRIII in the induction of accelerated nephrotoxic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **64**, 1406-1416.
- Galarneau L., Loranger A., Gilbert S., Marceau N. (2007). Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. *Exp Cell Res.* **313**, 179-194.

- Geara A. S., Azzi J., Jurewicz M., Abdi R. (2009). The renin-angiotensin system: an old, newly discovered player in immunoregulation. *Transplant Rev (Orlando)*. **23**, 151-158.
- Gerke P., Huber T. B., Sellin L., Benzing T., Walz G. (2003). Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*. **14**, 918-926.
- German M. S., Wang J., Chadwick R. B., Rutter W. J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeodomain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev*. **6**, 2165-2176.
- Goodrich D. W., Lee W. H. (1993). Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim Biophys Acta*. **1155**, 43-61.
- Gröne J., Weber B., Staub E., Heinze M., Klamann I., Pilarsky C., Hermann K., Castanos-Velez E., Röpcke S., Mann B., Rosenthal A., Buhr H. J. (2007). Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. *Int J Colorectal Dis*. **22**, 651-659.
- Gu W., Schneider J. W., Condorelli G., Kaushal S., Mahdavi V., Nadal-Ginard B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell*. **72**, 309-324.
- Gubler M. C., Levy M., Naizot C., Habib R. (1980). Glomerular basement membrane changes in hereditary glomerular diseases. *Ren Physiol*. **3**, 405-413.
- Guidera K. J., Satterwhite Y., Ogden J. A., Pugh L., Ganey T. (1991). Nail patella syndrome: a review of 44 orthopaedic patients. *J Pediatr Orthop*. **11**, 737-742.
- Guo G., Morrison D. J., Licht J. D., Quaggin S. E. (2004). WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J Am Soc Nephrol*. **15**, 2851-2856.
- Hamlington J. D., Jones C., McIntosh I. (2001). Twenty-two novel *LMX1B* mutations identified in nail patella syndrome (NPS) patients. *Hum Mutat*. **18**, 458.
- Hasan M. T., Schönic K., Berger S., Graewe W., Bujard H. (2001). Longterm, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*. **29**, 116-122.
- Hauser P. V., Perco P., Mühlberger I., Pippin J., Blonski M., Mayer B., Alpers C. E., Oberbauer R., Shankland S. J. (2009). Microarray and bioinformatics analysis of gene expression in experimental membranous nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. **112**, 43-58.
- Heidet L., Bogers E. M. H. F., Sich M., Zhang S. Y., Loirat C., Meyrier A., Broyer M., Landthaler G., Faller B., Sado Y., Knoers N. V. A. M., Gubler M. C. (2003). *In vivo* expression of putative *LMX1B* targets in nail-patella syndrome kidneys. *Am J Pathol*. **163**, 145-155.

- Helming L., Tomasello E., Kyriakides T. R., Martinez F. O., Takai T., Gordon S., Vivier E. (2008). Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci Signal.* **1**, 11.
- Hemmi H., Idozaga J., Suda K., Suda N., Kennedy K., Noda M., Aderem A., Steinman R. M. (2009). A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* **182**, 1278-1286.
- Herren T., Gerber P. A., Duru F. (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations. *Clin Res Cardiol.* **98**, 141-158.
- Herrera M. B., Bussolati B., Bruno S., Morando L., Mauriello-Romanazzi G., Sanavio F., Stamenkovic I., Biancone L., Camussi G. (2007). Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* **72**, 430-441.
- Hills C. E., Bland R., Wheelans D. C., Bennett J., Ronco P. M., Squires P. E. (2006). Glucose-evoked alterations in connexin43-mediated cell-to-cell communication in human collecting duct: a possible role in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* **291**, 1045-1051.
- Hiltschmann N., Barnikol H. U., Barnikol-Watanabe S., Götz H., Kratzin H., Thinnies F. P. (2001). The immunoglobulin-like genetic predetermination of the brain: the protocadherins, blueprint of the neuronal network. *Naturwissenschaften.* **88**, 2-12.
- Hirano M., Davis R. S., Fine W. D., Nakamura S., Shimizu K., Yagi H., Kato K., Stephan R. P., Cooper M. D. (2007). IgE immune complexes activate macrophages through FcγRI binding. *Nat Immunol.* **8**, 762-771.
- Hisada Y., Sugaya T., Yamanouchi M., Uchida H., Fujimura H., Sakurai H., Fukamizu A., Murakami K. (1999). Angiotensin II plays a pathogenetic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest.* **103**, 627-635.
- Holthöfer H. (2007). Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant.* **22**, 2124-2128.
- Holthöfer H., Ahola H., Solin M. L., Wang S., Palmen T., Luimula P., Miettinen A., Kerjaschki D. (1999). Nephlin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol.* **155**, 1681-1687.
- Holzman L. B., St. John P.L., Kovari I. A., Verma R., Holthöfer H., Abrahamson D. R. (1999). Nephlin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int.* **56**, 1481-1491.
- Honjoh K. I., Matsuura K., Machida T., Nishi K., Nakao M., Yano T., Miyamoto T., Iio M. (2009). Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from *Cyprinus carpio*, for cysteine

dioxygenase and cysteine sulfinic decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Amino Acids*. **38**, 1173-1183.

Hoyer J. R., Michael A. F., Vernier R. L. (1972). Renal disease in nail-patella syndrome: clinical and morphologic studies. *Kidney Int.* **2**, 231-238.

Hu Q., Dyson N., Harlow E. (1990). The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* **9**, 1147-1155.

Huang P. S., Patrick D. R. Edwards G., Goodhart P. J., Huber H. E., Miles L., Garsky V. M., Oliff A., Heimbrook D. C. (1993). Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 953-960.

Ilangumaran S., Forand-Boulerice M., Bousquet S. M., Savard A., Rocheleau P., Chen X. L., Dupuis G., Poussier P., Boulay G., Ramanathan S. (2009). Loss of GIMAP5 (GTPase of immunity-associated nucleotide binding protein 5) impairs calcium signaling in rat T lymphocytes. *Mol Immunol.* **46**, 1256-1259.

Iwata H., Nakagawa T., Nishiuchi K., Hiratsuka T., Satou R., Yoshioka Y., Fukui Y., Suzuki F., Nakamura Y. (2007). Ser84 of human renin contributes to the biphasic pH dependence of the renin-angiotensinogen reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**, 1279-1285.

Jacks T., Fazeli A., Schmitt E. M., Bronson R. T., Goodell M. A., Weinberg R. A. (1992). Effects of an *Rb* mutation in the mouse. *Nature*. **359**, 295-300.

Jakus Z., Németh T., Verbeek J. S., Mócsi A. (2008). Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol.* **180**, 618-629.

Jia H., Jiang X., Zhao Z., Ge Y., Lu J., Zhao Y., Cui B., Ning G. (2009). High frequency of down-regulation of E-cadherin detected in benign sporadic insulinomas by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Hum Pathol.* **40**, 1336-1341.

Jiang W., Cazacu S., Xiang C., Zenklusen J. C., Fine H. A., Berens M., Armstrong B., Brodie C., Mikkelsen T. (2008). FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF-κB signaling pathway. *Neoplasia*. **10**, 235-243.

Johnson J. D., Zhang W., Rudnick A., Rutter W. J., German M. S. (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol Cell Biol.* **17**, 3488-3496.

Johnson R. L., Tabin C. J. (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*. **90**, 979-990.

- Jurata L. W., Gill G. N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NL1. *Mol Cell Biol.* **17**, 5688-5698.
- Jurata L. W., Kenny D. A., Gill G. N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 11693-11698.
- Kaelin W. G. Jr., Krek W., Sellers W. R., DeCaprio J. A., Ajchenbaum F., Fuchs C. S., Chittenden T., Li Y., Farnham P. J., Blonar M. A., Livingston D. M., Flemington E. K. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell.* **70**, 351-364.
- Kanno J., Hutchin T., Kamada F., Narisawa A., Aoki Y., Matsubara Y., Kure S. (2007). Genomic deletion within GLDC is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia. *J Med Genet.* **44**, 69.
- Katoh Y., Katoh M. (2004). Identification and characterization of CDC50A, CDC50B and CDC50C genes in silico. *Oncol Rep.* **12**, 939-943.
- Kawachi H., Han G. D., Miyauchi N., Hashimoto T., Suzuki K., Shimizu F. (2009). Therapeutic targets in the podocyte: findings in anti-slit diaphragm antibody-induced nephropathy. *J Nephrol.* **22**, 450-456.
- Kawachi H., Miyauchi N., Suzuki K., Han G. D., Orikasa M., Shimizu F. (2006). Role of podocyteslit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton).* **11**, 274-81.
- Kee C., Cheong K. Y., Pham K., Waterer G. W., Temple S. E. (2008). Genetic variation in heat shock protein 70 is associated with septic shock: narrowing the association to a specific haplotype. *Int J Immunogenet.* **35**, 465-473.
- Khidr L., Chen P. L. (2006). RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. *Oncogene.* **25**, 5210-5219.
- Kim S. V., Mehal W. Z., Dong X., Heinrich V. Pypaert M., Mellman I., Dembo M., Mooseker M. S., Wu D., Flavell R. A. (2006). Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f. *Science.* **314**, 136-139.
- Kirchhoff F., Krebs C., Abdulhag U. N., Meyer-Schwesinger C., Maas R., Helmchen U., Hilgers K. F., Wolf G., Stahl R. A. K., Wenzel U. (2008). Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II. *Kidney Int.* **73**, 643-650.
- Klar J., Sandner P., Müller M. W., Kurtz A. (2002). Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.* **444**, 335-344.
- Kobayashi A., Kwan K. M., Carroll T. J., McMahon A.P., Mendelsohn C. L., Behringer R. R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development.* **132**, 2809-2823.

- Kocak B., Orug T., Turhan N., Ozcay N., Gonenc F. (2009). CD44 expression in renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Int Urol Nephrol.* **41**, 791-794.
- Krawchuk D., Kania A. (2008). Identification of genes controlled by LMX1B in the developing mouse limb bud. *Dev Dyn.* **237**, 1183-1192.
- Kreidberg J. A., Sariola H., Loring J. M., Maeda M., Pelletier J., Housman D., Jaenisch R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* **74**, 679-691.
- Kupfer R., Lang J., Williams-Skipp C., Nelson M., Bellgrau D., Scheinman R. I. (2007). Loss of a gimap/ian gene leads to activation of NF-kappaB through a MAPK-dependent pathway. *Mol Immunol.* **44**, 479-487.
- Ladwein M., Pape U. F., Schmidt D. S., Schnölzer M., Fiedler S., Langbein L., Franke W. W., Moldenhauer G., Zöller M. (2005). The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res.* **309**, 345-357.
- Lanier L. L. (2009). DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* **227**, 150-160.
- Lechler T., Fuchs E. (2007). Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J Cell Biol.* **176**, 147-154.
- Lechner M. S., Dressler G. R. (1997). The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech Dev.* **62**, 105-120.
- Lee C. G., Jenkins N. A., Gilbert D. J., Copeland N. G., O'Brien W. E. (1995). Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics.* **41**, 263-270.
- Lee E. Y., Chang C. Y., Hu N., Wang Y. C., Lai C. C., Herrup K., Lee W. H., Bradley A. (1992). Mice deficient for *Rb* are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature.* **359**, 288-294.
- Lenkkeri U., Mannikko M., Mc Cready P., Lamerdin J., Gribouval O., Niaudet P. M., Antignac C. K., Kashtan C. E., Homberg C., Olsen A., Kestilä M., Tryggvason K. (1999). Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (*NPHS1*) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet.* **1**, 51-61.
- Levashova Z. B., Sharma N., Timofeeva O. A., Dome J. S., Perantoni A. O. (2007). ELR+-CXC chemokines and their receptors in early metanephric development. *J Am Soc Nephrol.* **18**, 2359-2370.
- Lioni M., Brafford P., Andl C., Rustgi A., El-Deiry W., Herlyn M., Smalley K. S. (2007). Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol.* **170**, 709-721.

- Liu H., Shalev I., Manuel J., He W., Leung E., Crookshank J., Liu M. F., Diao J., Cattral M., Clark D. A., Isenman D. E., Gorczynski R. M., Grant D. R., Zhang L., Phillips M. J., Cybulsky M. I., Levy G. A. (2008). The FGL2-FcγRIIB pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression. *Eur J Immunol.* **38**, 3114-3126.
- Liu S., Vierthaler L., Tang W., Zhou J., Quarles L. D. (2008). FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol.* **19**, 2342-2350.
- Lucas G. L., Opitz J. M. (1966). The nail-patella syndrome. Clinical and genetical aspects of 5 kindreds with 38 affected family members. *J Pediatr.* **68**, 273-288.
- MacIver B., Cutler C. P., Yin J., Hill M. G., Zeidel M. L., Hill W. G. (2009). Expression and functional characterization of four aquaporin water channels from the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Exp Biol.* **212**, 2856-2863.
- Mancardi D. A., Iannascoli B., Hoos S., England P., Daëron M., Bruhns P. (2008). FcγRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest.* **118**, 3738-3750.
- Marini M., Giacomelli F., Seri M., Ravazzolo R. (2005). Interaction of the *LMX1B* and *PAX2* gene products suggests possible molecular basis of differential phenotypes in nail-patella syndrome. *Eur J Hum Genet.* **13**, 789-792.
- Mathew S. O., Rao K. K., Kim J. R., Bambard N. D., Mathew P. A. (2009). Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol.* **39**, 1632-1641.
- Mbikay M., Seidah N. G., Chrétien M. (2001). Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochem J.* **357**, 329-342.
- McIntosh I., Clough M. V., Schäffer A. A., Puffenberger E. G., Horton V. K., Peters K., Abbott M. H., Roig C. M., Cutone S., Ozelius L., Kwiatkowski D. J., Pyeritz R. E., Brown L. J., Pauli R. M., McCormick M. K., Francomano C. A. (1997). Fine mapping of the nail-patella syndrome locus at 9q34. *Am J Hum Genet.* **60**, 133-142.
- McIntosh I., Dreyer S. D., Clough M. V., Dunston J. A., Eyaid W., Roig C. M., Montgomery T., Ala-Mello S., Kaitila I., Winterpacht A., Zabel B., Frydman M., Cole W. G., Francomano C. A., Lee B. (1998). Mutation analysis of *LMX1B* gene in nail-patella syndrome patients. *Am J Hum Genet.* **63**, 1651-1658.
- McVicar D. W., Trinchieri G. (2009). CSF-1R, DAP12 and beta-catenin: a ménage à trois. *Nat Immunol.* **10**, 681-683.
- Meijer H. A., Thomas A. A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J.* **367**, 1-11.

- Miao J., Fan Q., Cui Q., Zhang H., Chen L., Wang S., Guan N., Guan Y., Ding J. (2009). Newly identified cytoskeletal components are associated with dynamic changes of podocyte foot processes. *Nephrol Dial Transplant*. **24**, 3297-3305.
- Millichip M. I., Dallas D. J., Wu E., Dale S., McKie N. (1998). The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. **245**, 594-598.
- Miner J. H., Morello R., Andrews K. L., Li C., Antignac C., Shaw A. S., Lee B. (2002). Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest*. **109**, 1065-1072.
- Mocellin S., Rossi C. R. (2007). Principles of gene microarray data analysis. *Adv Exp Med Biol*. **593**, 19-30.
- Moeller M. J., Sanden S. K., Soofi A., Wiggins R. C., Holzman L. B. (2003). Podocyte-specific expression of Cre recombinase in transgenic mice. *Genesis*. **35**, 39-42.
- Morello R., Zhou G., Dreyer S. D., Harvey S. J., Ninomiya Y., Thorner P. S., Miner J. H., Cole W., Winterpacht A., Zabel B., Oberg K. C., Lee B. (2001). Regulation of the glomerular basement membrane collagen expression by *LMX1B* contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat Genet*. **27**, 205-208.
- Moriguchi T., Hamada M., Morito N., Terunuma T., Hasegawa K., Zhang C., Yokomizo T., Esaki R., Kuroda E., Yoh K., Kudo T., Nagata M., Greaves D. R., Engel J. D., Yamamoto M., Takahashi S. (2006). MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol*. **26**, 5715-5727.
- Mueller P., Massner J., Jayachandran R., Combaluzier B., Albrecht I., Gatfield J., Blum C., Ceredig R., Rodewald H. R., Rolink A. G., Pieters J. (2008). Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering. *Nat Immunol*. **9**, 424-431.
- Murai M., Turovskaya O., Kim G., Madan R., Karp C. L., Cheroutre H., Kronenberg M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. **10**, 1178-1184.
- Nava P., Laukoetter M. G., Hopkins A. M., Laur O., Gerner-Smidt K., Green K. J., Parkos C. A., Nusrat A. (2007). Desmoglein-2: a novel regulator of apoptosis in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell*. **18**, 4565-4578.
- Osunkoya A. O., Cohen C., Lawson D., Picken M. M., Amin M. B., Young A. N. (2009). Claudin-7 and claudin-9: immunohistochemical markers for the differential diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Hum Pathol*. **40**, 206-210.
- Pan P. W., Rodriguez A., Parkkila S. (2007). A systematic quantification of carbonic anhydrase transcripts in the mouse digestive system. *BMC Mol Biol*. **8**, 22.

- Paulsson J. M., Held C., Jacobson S. H., Lundahl J. (2009). In vivo extravasated human monocytes have an altered expression of CD16, HLA-DR, CD86, CD36 and CX(3)CR1. *Scand J Immunol.* **70**, 368-376.
- Paust H. J., Turner J. E., Steinmetz O. M., Peters A., Heymann F., Hölscher C., Wolf G., Kurts C., Mittrücker H. W., Stahl R. A., Panzer U. (2009). The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* **20**, 969-979.
- Petzke M. M., Brooks A., Krupna M. A., Mordue D., Schwartz I. (2009). Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J Immunol.* **183**, 5279-5292.
- Pockley A. G., Calderwood S. K., Multhoff G. (2009). The atheroprotective properties of Hsp70: a role for Hsp70-endothelial interactions? *Cell Stress Chaperones.* **14**, 545-553.
- Pressman C. L., Chen H., Johnson R. L. (2000). Lmx1b, a LIM homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye. *Genesis.* **26**, 15-25.
- Prozialeck W. C., Edwards J. R. (2007). Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacol Ther.* **114**, 74-93.
- Putaala H., Soininen R., Kilpeläinen P., Wartiovaara J., Tryggvason K. (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet.* **10**, 1-8.
- Quaggin S. E., Schwartz L., Cui S., Igarashi P., Deimling J. Post M., Rossant J. (1999). The basic-helix-loop-helix protein Pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development.* **126**, 5771-5783.
- Rantanen M., Palmén T., Pätäri A., Ahola H., Lehtonen S., Aström E., Floss T., Vauti F., Wurst W., Ruiz P., Kerjaschki D., Holthöfer H. (2002). Nephrin TRAP mice lack slit diaphragms and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions. *J Am Soc Nephrol.* **13**, 1586-1594.
- Rasche A., Suleiman H., Neumann T., Witzgall R. (2007). Role of transcription factors in podocytes. *Nephron Exp Nephrol.* **106**, 60-66.
- Reiser J., Kriz W., Kretzler M., Mundel P. (2000). The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol.* **11**, 1-8.
- Riddle R. D., Ensini M., Nelson C., Tsuchida T., Jessell T. M., Tabin C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell.* **83**, 631-640.

- Riekenberg S., Farhat K., Debarry J., Heine H., Jung G., Wiesmüller K. H., Ulmer A. J. (2009). Regulators of G-protein signalling are modulated by bacterial lipopeptides and lipopolysaccharide. *FEBS J.* **276**, 649-659.
- Roberts T. L., Idris A., Dunn J. A., Kelly G. M., Burnton C. M., Hodgson S., Hardy L. L., Garceau V., Sweet M. J., Ross I. L., Hume D. A., Stacey K. J. (2009). HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science.* **323**, 1057-1060.
- Roche J. K., Keepers T. R., Gross L. K., Seaner R. M., Obrig T. G. (2007). CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 are critical effectors and potential targets for therapy of Escherichia coli O157:H7-associated renal inflammation. *Am J Pathol.* **170**, 526-537.
- Rodewald R., Karnovsky M. J. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol.* **60**, 423-433.
- Rodriguez W., Mold C., Kataranovski M., Hutt J. A., Marnell L. L., Verbeek J. S., Du Clos T. W. (2007). C-reactive protein-mediated suppression of nephrotoxic nephritis: role of macrophages, complement, and Fcγ receptors. *J Immunol.* **178**, 530-538.
- Rohr C., Prestel J., Heidet L., Hosser H., Kriz W., Johnson R.L., Antignac C., Witzgall R. (2002). The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes. *J Clin Invest.* **109**, 1073-1082.
- Ruch R. J. (2000). Role of gap junctions in cellular growth control and neoplasia: Evidence and mechanisms. In *Gap junctions – Molecular basis of cell communication in health and disease* (C. Peracchia, Ed.). Academic Press. 535-554.
- Ruch R. J. (2002). Intercellular communication, homeostasis, and toxicology. *Toxicological Sciences.* **68**, 265-266.
- Ruotsalainen V., Ljungberg P., Wartiovaara J., Lenkkeri U., Kestilä M., Jalanko H., Holmberg C., Tryggvason K. (1999). Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 7962-7967.
- Rutledge E. A., Fuller J. M., Van Yserloo B., Moralejo D. H., Ettinger R. A., Gaur P., Hoehna J. L., Peterson M. R., Jensen R., Kwitek A. E., Lernmark A. (2009). Sequence variation and expression of the Gimap gene family in the BB rat. *Exp Diabetes Res.* **2009**, 835650.
- Sadl V. S., Jin F., Yu J., Cui S., Holmyard D., Quaggin S. E., Barsh G. S., Cordes S. P. (2002). The mouse *kreisler* (*Krml1/MafB*) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells. *Dev Biol.* **249**, 16-29.
- Sage J., Mulligan G. J., Attardi L. D., Miller A., Chen S., Williams B., Theodorou E., Jacks T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G₁ control and immortalization. *Genes Dev.* **14**, 3037-3050.

- Sanchez C. P., He Y. Z. (2007). Bone growth during daily or intermittent calcitriol treatment during renal failure with advanced secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* **72**, 582-591.
- Schenk B. I., Petersen F., Flad H. D., Brandt E. (2002). Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL) 7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J Immunol.* **169**, 2602-2610.
- Schmidt E. E., Taylor D. S., Prigge J. R., Barnett S., Capecchi M. R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 13702-13707.
- Schnabel E., Anderson J. M., Farquhar M. G. (1990). The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol.* **111**, 1255-1263.
- Schönig K., Schwenk F., Rajewsky K., Bujard H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **30**, e134.
- Schramme A., Abdel-Bakky M. S., Kämpfer-Kolb N., Pfeilschifter J., Gutwein P. (2008). The role of CXCL16 and its processing metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 in the proliferation and migration of human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **370**, 311-316.
- Seri M., Melchionda S., Dreyer S., Marini M., Carella M., Cusano R., Piemontese M. R., Caroli F., Silengo M., Zelante L., Romeo G., Ravazzolo R., Gasparini P., Lee B. (1999). Identification of LMX1B gene point mutations in Italian patients affected with nail-patella syndrome. *Int J Mol Med.* **4**, 285-290.
- Shalev I., Liu H., Kosciak C., Bartczak A., Javadi M., Wong K. M., Maknojia A., He W., Liu M. F., Diao J., Winter E., Manuel J., McCarthy D., Cattral M., Gommerman J., Clark D. A., Phillips M. J., Gorczynski R. R., Zhang L., Downey G., Grant D., Cybulsky M. I., Levy G. (2008). Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol.* **180**, 249-260.
- Shen X., Meza-Carmen V., Puxeddu E., Wang G., Moss J., Vaughan M. (2008). Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**, 18788-18793.
- Shigehara T., Zaragoza C., Kitiyakara C., Takahashi H., Lu H., Moeller M., Holzman L. B., Kopp J. B. (2003). Inducible podocyte-specific gene expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol.* **14**, 1998-2003.
- Shih N. Y., Li J., Cotran R., Mundel P., Miner J. H., Shaw A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol.* **159**, 2303-2308.

Siu K. L., Chan C. P., Chan C., Zheng B. J., Din D. Y. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein does not modulate transcription of the human FGL2 gene. *J Gen Virol.* **90**, 2107-2113.

Smidt M. P., Asbreuk C. H., Cox J. J., Chen H., Johnson R. L., Burbach J. P. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci.* **3**, 337-341.

Smith B., Hill C., Godfrey E. L., Rand D., van den Berg H., Thornton S., Hodgkin M., Davey J., Ladds G. (2009). Dual positive and negative regulation of GPCR signaling by GTP hydrolysis. *Cell Signal.* **21**, 1151-1160.

Smith K. D. (2009). Toll-like receptors in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **18**, 189-196.

Smith-McCune K., Kalman D., Robbins C., Shivakumar S., Yuschenko L., Bishop J. M. (1999). Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 6999-7004.

Sökelland J., Rübber H. (2008). Taschenlehrbuch Urologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart.*

Stappenbeck T. S., Bornslaeger E. A., Corcoran C. M., Luu H. H., Virata M. L., Green K. J. (1993). Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks. *J Cell Biol.* **123**, 691-705.

Stridsberg M., Eriksson B., Janson E. T. (2008). Measurement of secretogranins II, III, V and proconvertases 1/3 and 2 in plasma from patients with neuroendocrine tumors. *Regul Pept.* **148**, 95-98.

Suleiman H., Heudobler D., Raschta A. S., Zhao Y., Zhao Q., Hertting I., Vitzthum H., Moeller M. J., Holzman L. B., Rachel R., Johnson R., Westphal H., Rasche A., Witzgall R. (2007). The podocyte-specific inactivation of *Lmx1b*, *Ldb1* and *E2a* yields new insight into transcriptional network in podocytes. *Developmental Biology*, **304**, 701-712.

Suzuki Y., Shirato I., Okumura K., Ravetch J. V., Takai T., Tomino Y., Ra C. (1998). Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* **54**, 1166-1174.

Sweeney E., Fryer A., Mountford R., Green A., McIntosh I. (2003). Nail patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology. *J Med Genet.* **40**, 153-162.

Tabata S., Kuroki K., Maita N., Wang J., Shiratori I., Arase H., Kohda D., Maenaka K. (2008). Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human paired Ig-like type 2 receptor alpha (PILRalpha). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **64**, 44-46.

Takemoto M., He L., Norlin J., Patrakka J., Xiao Z., Petrova T., Bondjers C., Asp J., Wallgard E., Sun Y., Samuelsson T., Mostad P., Lundin S., Miura N., Sado Y., Alitalo K., Quaggin S. E., Tryggvason K., Betsholtz C. (2006). Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J.* **25**, 1160-1174.

Takuwa Y., Takuwa N., Sugimoto N. (2002). The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem.* **131**, 767-771.

Tanigawa K., Suzuki K., Kimura H., Takeshita F., Wu H., Akama T., Kawashima A., Ishii N. (2009). Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signaling in Mycobacterium leprae infection. *Clin Exp Immunol.* **156**, 495-501.

Tay H. K., Melendez A. J. (2004). Fcgamma RI-triggered generation of arachidonic acid and eicosanoids requires iPLA2 but not cPLA2 in human monocytic cells. *J Biol Chem.* **279**, 22505-22513.

Thomas B. N., Buxbaum L. U. (2008). FcgammaRIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic Leishmania Mexicana lesions. *Infect Immun.* **76**, 623-631.

Thurman J. M., Lenderink A. M., Royer P. A., Coleman K. E., Zhou J., Lambris J. D., Nemenoff R. A., Quigg R. J., Holers V. M. (2007). C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. *J Immunol.* **178**, 1819-1828.

Thyagarajan B., Guimaraes M. J., Groth A. C., Calos M. P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene.* **244**, 47-54.

Tomlinson D. C., L'Hôte C. G., Kennedy W., Pitt E., Knowles M. A. (2005). Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 3 produces a secreted isoform that inhibits fibroblast growth factor-induced proliferation and is repressed in urothelial carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **65**, 10441-10449.

Trosko J. E., Chang C. C., Upham B., Wilson M. (1998). Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signaling leading to altered gap junctional intercellular communication. *Toxicol Lett.* **102-103**, 71-78.

Trotta T., Costantini S., Colonna G. (2009). Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: Putative target for new drug design. *Mol Immunol.* **47**, 332-339.

Turner J. W. (1933). An hereditary arthrodysplasia associated with hereditary dystrophy of the nails. *JAMA.* **100**, 882-884.

Van den Bossche J., Bogaert P., van Hengel J., Guerin C. J., Berx G., Movahedi K., Van den Bergh R., Pereira-Fernandes A., Geuns J. M., Pircher H., Dorny P., Grooten J., De Baetselier P.,

- Van Ginderachter J. A. (2009). Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes. *Blood*. **114**, 4664-4674.
- Van der Veen B. S., Petersen A. H., Belperio J.A., Satchell S. C., Mathieson P. W., Molema G., Heeringa P. (2009). Spatiotemporal expression of chemokines and chemokine receptors in experimental anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol*. **158**, 143-153.
- Vaughan M. R., Pippin J. W., Griffin S. V., Krofft R., Fleet M., Haseley L., Shankland S. J. (2005). ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo. *Kidney Int*. **69**, 133-144.
- Verkman A. S. (2008). Dissecting the roles of aquaporins in renal pathophysiology using transgenic mice. *Semin Nephrol*. **28**, 217-226.
- Verkman A. S. (2009). Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol*. **190**, 359-381.
- Vernier R. L., Hoyer J. R., Michael A. F. (1974). The nail-patella syndrome – pathogenesis of the kidney lesion. *Birth Defects*. **10**, 57-59.
- Vogel A., Rodriguez C., Warnken W., Izpisua Belmonte J. C. (1995). Dorsal cell fate specified by chick Lmx1 during vertebrate limb development. *Nature*. **378**, 716-720.
- Vollrath D., Jaramillo-Babb V. L., Clough M. V., McIntosh I., Scott K. M., Lichter P. R., Richards J. E. (1998). Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet*. **7**, 1091-1098.
- Wagner K. U., Wall R. J., St-Onge L., Gruss P., Wynshaw-Boris A., Garrett L., Li M., Furth P. A., Hennighausen L. (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res*. **25**, 4323-4330.
- Wagner N., Wagner K. D., Xing Y., Scholz H., Schedl A. (2004). The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol*. **15**, 3044-3051.
- Weaver T. A., Charafeddine A. H., Kirk A. D. (2008). Costimulation blockade: towards clinical application. *Front Biosci*. **13**, 2120-2139.
- Wei C., Möller C. C., Altintas M. M., Li J., Schwarz K., Zacchinga S., Xie L., Henger A., Schmid A., Rastaldi M. P., Cowan P., Kretzler M., Parrilla R., Bendayan M., Gupta V., Nikolic B., Kalluri R., Carmeliet P., Mundel P., Reiser J. (2008). Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med*. **14**, 55-63.
- Weinberg R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. **81**, 323-330.

Welch P.J., Wang J.Y.J. (1993). A C-terminal protein binding domain in RB regulates the nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*. **75**, 779-790.

Welch P.J., Wang J.Y.J. (1995). Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes Dev.* **9**, 31-46.

Welsch U. (Hrsg.) (2003). Lehrbuch Histologie. *Urban und Fischer Verlag, München*.

Wilson S. H., Bailey A. M., Nourse C. R., Mattei M. G., Byrne J. A. (2001). Identification of MAL2, a novel member of the mal proteolipid family, though interactions with TPD52-like proteins in the yeast two-hybrid system. *Genomics*. **76**, 81-88.

Witzgall R. (2008). How are podocytes affected in nail-patella syndrome? *Pediatr Nephrol.* **23**, 1017-1020.

www.histonet2000.de

Xavier C. P., Eichinger L., Fernandez M. P., Morgan R. O., Clemen C. S. (2008). Evolutionary and functional diversity of coronin proteins. *Subcell Biochem.* **48**, 98-109.

Xin H., Pramanik R., Choubey D. (2003). Retinoblastoma (Rb) protein upregulates expression of the Ifi202 gene encoding an interferon-inducible negative regulator of cell growth. *Oncogene*. **22**, 4775-4785.

Yamauchi M., Hashimoto M., Ichiyama K., Yoshida R., Hanada T., Muta T., Komune S., Kobayashi T., Yoshimura A. (2007). Ifi202, an IFN-inducible candidate gene for lupus susceptibility in NZB/W F1 mice, is a positive regulator for NF-kappaB activation in dendritic cells. *Int Immunol.* **19**, 935-942.

Yoo S. M., Choi J. H., Lee S. Y., Yoo N. C. (2009). Applications of DNA microarray in disease diagnostics. *J Microbiol Biotechnol.* **19**, 635-646.

Yu Q., Cok S. J., Zeng C., Morrison A. R. (2003). Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR). *J Biol Chem.* **278**, 1579-1584.

Yuan H., Takeuchi E., Taylor G. A., McLaughlin M., Brown D., Salant D J. (2002). Nephritin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* **13**, 946-956.

Zalvide J., DeCaprio J. A. (1995). Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-T-antigen-mediated transformation. *Mol Cell Biol.* **15**, 5800-5810.

Zaragoza D. B., Wilson R. R., Mitchell B. F., Olson D. M. (2006). The interleukin 1beta-induced expression of human prostaglandin F2alpha receptor messenger RNA in human myometrial-derived ULTR cells requires the transcription factor, NFkappaB. *Biol Reprod.* **75**, 697-704.

Zhang H. (2007). Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol.* **210**, 567-574.

Zhang Y., Yoshida Y., Nameta M., Xu B., Taguchi I., Ikeda T., Fujinaka H., Mohamed S. M., Tsukaguchi H., Harita Y., Yaoita E., Yamamoto T. (2010). Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* **25**, 1785-1795.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Magdalena Emma Schaffer

Geboren am 08.09.1986 in Regensburg

Familienstand ledig

Schulbildung:

1992 bis 1996

Besuch der Grundschule Blaibach

1996 bis 2005

Benedikt-Stattdler Gymnasium Kötzing

2005

Abitur

Studium:

2005 bis 2007

Studium der Humanmedizin in der

Vorklinik der Universität Regensburg

Herbst 2007

Erste ärztliche Prüfung

2007 bis 2011

Studium der Humanmedizin an der Klinik
der Universität Regensburg

Herbst 2011

Zweite ärztliche Prüfung

Promotion:

Februar 2008 bis

Promotion am Lehrstuhl für Molekulare

August 2009

und Zelluläre Anatomie der Universität

Regensburg: *Charakterisierung*

induzierbarer, podozytenspezifischer

Lmx1b Knock-out Mäuse

(Betreuer: Prof. Dr. Witzgall)

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Witzgall bedanken, der mir in den anderthalb Jahren während meiner Arbeit und auch danach noch während des Schreibens immer hilfreich zur Seite stand und bei Problemen stets kurzfristig zu erreichen war.

Auch Jürgen Kastner gilt mein besonderer Dank, zum einen für die Zusammenarbeit bei den Versuchen mit anti-GBM Serum, zum anderen auch allgemein für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und den, wenn auch leider seltenen, Email-Kontakt nach seinem Ausscheiden aus dem Labor.

Vielen Dank auch an Marion Kubitza, die immer eine gute Ansprechpartnerin für praktische Probleme war. Danke aber auch für all die Unterhaltungen, die die Wartezeiten zwischen einzelnen Versuchen überbrückten!

Danken möchte ich auch Larissa Osten, die mir als einzige in den frühen Morgenstunden vor sieben Uhr im Labor Gesellschaft leistete und das Öfteren Arbeiten für mich übernahm, wenn ich mal wieder zum Klinikum weg musste.

Mein Dank gilt auch den Tierpflegern und hier insbesondere Franz Wiesenmayer für seine regelmäßige Hilfe bei den Mäusen, auch wenn ich zu einem noch so ungünstigen Zeitpunkt vorbei kam.

Ebenfalls danken möchte ich Karin Schadendorf, Christine Meese und Helga Schmidt für die Erstellung meiner elektronenmikroskopischen Bilder.

Ton Maurer danke ich für die Bearbeitung meiner lichtmikroskopischen Bilder, auch wenn ich sie leider letztendlich nicht verwenden konnte, sondern selbst neue erstellen musste.

Bei Uwe de Vries möchte ich mich für seine geduldige Hilfe bei allen technischen Problemen, sei es am Laptop oder an der UV-Lampe, bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei Anne-Sarah Raschta, Astrid Neumann und Tillmann Burghardt bedanken, mit denen ich das Büro teilen durfte und mit denen ich immer viel Spaß hatte.